

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Effet de l'atrazine sur l'expression de l'aromatase au niveau des gonades de poissons rouges juvéniles (*Carassius auratus auratus* L.)

Nadzialek, Stéphanie

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**EFFET DE L'ATRAZINE SUR L'EXPRESSION DE L'AROMATASE AU NIVEAU
DES GONADES DE POISSONS ROUGES JUVENILES (*CARASSIUS AURATUS*
AURATUS L.)**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Stéphanie NADZIALEK

Août 2003

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone : + 32(0) 81.72.44.18. – Téléfax : + 32(0) 81.72.44.20.
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.b/fundp.html>

EFFET DE L'ATRAZINE SUR L'EXPRESSION DE L'AROMATASE AU NIVEAU DES GONADES DE POISSONS ROUGES JUVENILES (*CARASSIUS AURATUS* *AURATUS* L.)

NADZIALEK Stéphanie

Résumé

L'atrazine, herbicide largement utilisé de part le monde, est soupçonné toucher l'aromatase, enzyme qui convertit la testostérone en œstradiol, en augmentant son activité. Des poissons rouges (*Carassius auratus auratus*) des deux sexes et sexuellement immatures ont été exposés à deux doses sublétales (100 et 1000 µg/l) à l'atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-*s*-triazine) en contamination chronique (30 et 56 jours). L'expression de l'aromatase et les niveaux de stéroïdes plasmatiques (11-kétotestostérone et œstradiol) ont été évalués. Dans un premier temps, il a été question de valoriser la technique PCR en temps réel pour l'expression du gène de l'aromatase à partir de tissu de gonades. Seule l'expression de l'aromatase dans les ovaires a été évaluée et aucun effet de l'atrazine n'a pu être mis en évidence. Les niveaux plasmatiques en 11-kétotestostérone présentent une tendance à la diminution chez les mâles intoxiqués après 56 jours à la dose de 1000 µg/l. Chez les femelles, nous avons une diminution significative de la 11-kétotestostérone dans les mêmes conditions présentées pour les mâles. Aucun effet n'a pu être décelé en ce qui concerne les niveaux plasmatiques en œstradiol chez les mâles comme chez les femelles intoxiquées.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Août 2003

Promoteur : P. Kestemont

Liste des abréviations et unités:

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
AhR	« aryl hydrocarbon receptor »
ARN	acide ribonucléique
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ARNm	acide ribonucléique messenger
BKME	« bleached kraft mill effluent » ou effluent provenant d'usine de blanchiment de la pâte à papier
°C	degré celcius
Ct	« threshold cycle » ou cycle seuil
CYP450	cytochrome P450
DDE	dichlorodiphenyl dichloroethylene
DDT	dichlorodiphenyl trichloroethane
dH₂O	eau distillée
DO	densité optique
DRE	dioxin response element
E₂	œstradiol
EDCs	« endocrine disrupting chemicals » ou perturbateur endocrinien
ER	récepteur œstrogénique
ERE	estrogen responsive element
FSH	hormone folliculo-stimulante
GSI	« Gonadal-Somatic Index » ou indice gonado-somatique
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormones
GtH	gonadotropine
h	heure
hpf	heure de post-fertilisation
HPOA	aire préoptique
l	litre
LH	hormone lutéinisante
mg	milligramme
min	minute
ml	millilitre
ng	nanogramme
NTC	« no template control » ou contrôle sans matrice d'ADN
PaH	hydrocarbure aromatique polycyclique
pb	paire de bases
PCB	polychlorinated biphenyl
PCDD	polychlorinated dibenzodioxin
RIA	radio immunoassay
RGS	cellule du ganglion rétinien
rpm	révolution par minute
RT-PCR	réaction en chaîne de polymérisation suite à une rétro-transcription d'ARN
RT	rétro-transcription
sec	seconde
SHBG	sex hormone-binding globulin
SNC	système nerveux central
STW	« sewage treatment work » ou effluent domestiques
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodisbenzyl- <i>p</i> -dioxin

Tm	température de melting
Vtg	vitellogénine
Zr-p	Zr-protein
γ-HCH	γ-hexachlorocyclohexane
μg	microgramme
μl	microlitre
μM	micromolaire
5α-DHT	5α-dihydrotestostérone
17α,20β-P	17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one
17β-HSD	17β-hydroxy steroid déshydrogénase

Table des matières :

I Synthèse bibliographique	8
1 Impact des polluants sur le système reproducteur des poissons : une perturbation endocrinienne	8
1.1 Introduction	8
1.2 Contrôle endocrinien de la reproduction chez le poisson	9
1.3 Qu'est ce qu'un perturbateur endocrinien ?	9
1.4 Perturbations du système reproducteur	10
1.4.1 Impact des perturbateurs endocriniens sur le système reproducteur mâle et femelle	10
1.4.1.1 Etude de base montrant la perturbation endocrinienne : introduction de la vitellogénine chez les mâles et les juvéniles	11
1.4.1.2 Effets de la morphologie des testicules et des ovaires	11
a) Altération du développement gonadal induit par les STWs	11
b) Altération du développement gonadal induit par les BKMEs	12
c) Altération du développement gonadal induit par les pesticides	12
1.5 Modes d'action des perturbateurs endocriniens (EDCs)	13
1.5.1 Interférence avec le contrôle endocrinien de l'axe hypothalamo-hypophysaire	13
1.5.2 Interférence avec les enzymes intervenant dans la stéroïdogénèse	14
1.5.3 Interférence avec les protéines de transport	15
1.5.4 Interférence avec l'activité des récepteurs hormonaux : agonisme, antagonisme	15
1.5.5 Interférence avec l'élimination des stéroïdes	16
2 Cytochrome P450 aromatase ou le gène <i>CYP19</i>	16
2.1 Superfamille des cytochromes P450s	16
2.1.1 Réactions de biotransformations	16
2.1.2 Le cytochrome P450	17
2.2 L'aromatase ou le gène <i>CYP19</i>	18
2.2.1 Arbre phylogénétique de la protéine P450arom	18
2.2.2 Evidence de deux gènes <i>CYP19</i> fonctionnels chez les téléostéens	19
2.2.3 Expression du <i>CYP19</i> durant la phase embryogénique	20
2.3 Variations saisonnières de l'expression de l'aromatase au niveau de l'ovaire et du cerveau	20
2.3.1 Variations saisonnières au niveau de l'ovaire	20
2.3.2 Variations saisonnières au niveau du cerveau	21
2.4 Effets des agents endogènes et exogènes sur l'expression de l'aromatase	21
2.4.1 Chez l'homme	21
2.4.2 Chez les autres vertébrés	22
3 Atrazine	23
3.1 L'atrazine et son utilisation	23
3.1.1 Mode d'action de l'atrazine en tant qu'herbicide	23
3.1.2 Régime d'utilisation et sa limitation	23
3.2 Comportement dans les masses d'eau	24
3.2.1 Caractéristiques physico-chimiques	24
3.2.2 Entrée dans les masses d'eau	24
3.2.3 Dégradation de l'atrazine	24

3.3	Caractéristiques toxiques de l'atrazine.....	25
3.3.1	Accumulation et élimination de l'atrazine dans les organismes aquatiques	25
3.3.2	Toxicité de l'atrazine.....	25
3.3.3	Effets de l'atrazine sur l'aromatase.....	25
II	Objectifs du mémoire	27
III	Matériel et méthodes	
1	Matériel.	28
1.1	Espèce ciblée.....	28
1.2	Dispositif expérimental de contamination.....	28
1.2.1	Schéma expérimental.....	28
1.2.2	Contamination des bassins par l'atrazine.....	29
1.2.3	Prélèvements des poissons soumis à l'expérience.....	29
2	Méthodes	30
2.1	Extraction de l'ARN total.....	30
2.1.1	Extraction de l'ARN total au Tripure® (Roche).....	30
2.1.2	Extraction de l'ARN total à l'aide du kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System, Invitrogen, Carlsbad, USA.....	31
2.2	Dosage des acides nucléiques par spectrophotométrie.....	32
2.3	Real time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR).....	32
2.3.1	Transcription Inverse (RT).....	33
2.3.1.1	Traitement à la DNase.....	33
2.3.1.2	Transcription inverse.....	33
2.3.2	PCR Real Time.....	34
a)	Recherche des couples d'amorces appropriées.....	34
b)	Détermination de la courbe de dilution de l'ADN.....	34
c)	Détermination de la concentration en amorces.....	35
d)	Quantification de l'expression des gènes.....	35
e)	Cycles Real Time PCR.....	35
f)	Analyse des résultats.....	35
g)	Vérification du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.....	35
2.4	Dosage des hormones sexuelles :l'œstradiol, la testostérone et la 11-kétotestostérone.....	36
2.4.1	Extraction des stéroïdes.....	37
2.4.2	Compétition, incubation.....	37
IV	Résultats et discussion	39
1	Introduction	39
2	Mises au point de la technique de RT-PCR en temps réel sur des transcrits de <i>CYP19a</i>	39
2.1	Détermination du couple d'amorce spécifique de <i>CYP19a</i> e de la b-actine	39
2.1.1	Séquence des amorces.....	39
2.1.2	Caractéristiques particulières des amorces.....	40
2.2	Détermination de la spécificité de la PCR.....	40
2.2.1	Mises au point réalisées sur du tissu de gonade femelle.....	41

2.2.1.1	Détermination de la spécificité de la PCR après l'extraction de l'ARN total au Tripure®.....	41
2.2.1.2	Détermination de la spécificité de la PCR après l'extraction de l'ARN total au moyen du kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System, Invitrogen, Carlsbad, USA.....	43
2.2.2	Mises au point réalisées sur des gonades mâles.....	44
2.3	Détermination de la concentration des amorces.....	46
2.4	Détermination de l'efficacité de la PCR.....	47
3	Relation entre l'indice gonadosomatique et les niveaux relatifs de transcrits d'aromatase .. .	50
4	Dosage des hormones sexuelles : l'œstradiol et la 11-kétotestostérone.....	50
4.1	La 11-kétotestostérone.....	50
a	Chez les individus mâles.....	51
b	Chez les individus femelles.....	51
4.2	L'œstradiol.....	52
a	Chez les individus mâles.....	52
b	Chez les individus femelles.....	53
V	Discussion générale et perspective.....	54
VI	Références.....	57
VII	Annexes.....	63

I

Introduction

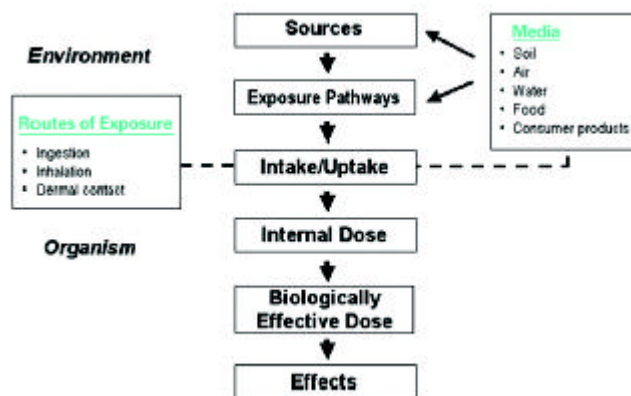


Figure 1 : Cheminement des effets provoqués par une exposition à des perturbateurs endocriniens (Damstra *et al.*, 2002).

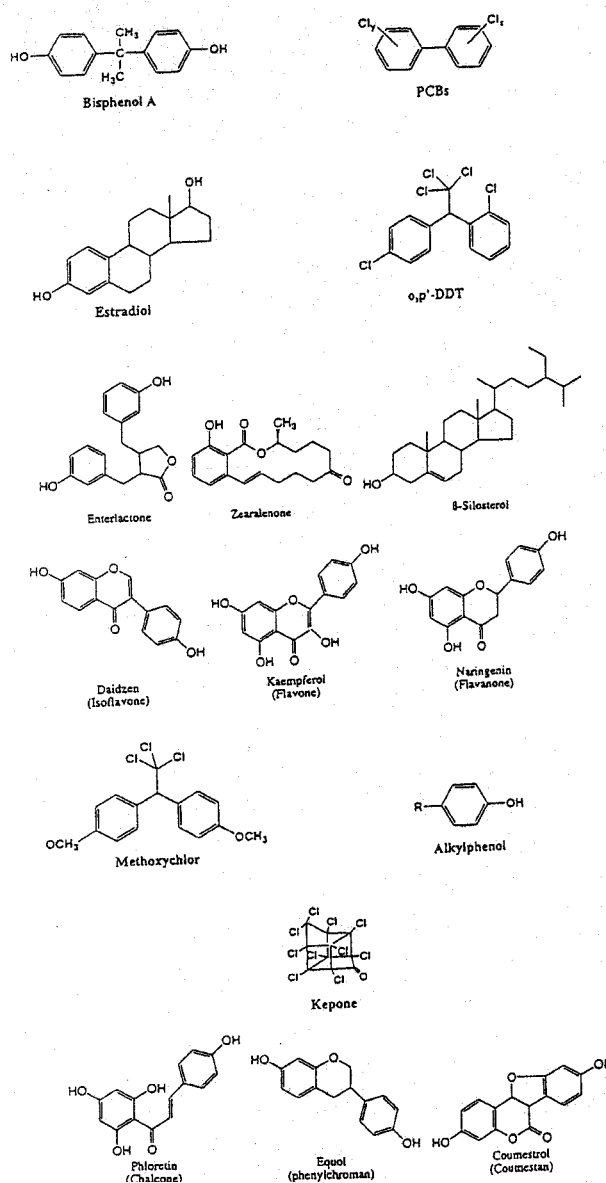


Figure 2 : Homologie de structure entre les composés naturels et synthétiques prouvant des perturbations du système endocrinien (Arukwe, 2001). Le Bisphénol A, les PCBs, l'*o-p'*DDT, le méthoxychlore, l'alkylphenol, le kepone sont des composés synthétiques.

I. Synthèse bibliographique

1. Impact des polluants sur le système reproducteur des poissons : une perturbation endocrinienne

1.1 Introduction

Suite à la publication de Rachel Carson (1962) « Le printemps silencieux », il y eut une prise de conscience générale que la présence de certaines substances introduites par l'homme dans l'environnement pouvaient exercer des effets néfastes sur les populations sauvages ainsi que sur la santé humaine (fig.1). Lors de ces dernières décennies, le monde scientifique a témoigné d'un intérêt croissant sur les possibles effets délétères suite à une exposition à ces substances.

Aujourd'hui, il est largement reconnu que certains composés possèdent la capacité de moduler le fonctionnement du système endocrinien et dès lors, interférer avec le processus normal de développement et de reproduction (Arukwe, 2001). Ces perturbations ont notamment été démontrées chez les poissons, amphibiens, reptiles, mammifères et soupçonnées chez l'homme.

Les perturbateurs du système endocrinien ou EDCs incluent une large variété de substances comme les hormones naturelles (phytohormones) ou synthétiques, les pesticides, les composés utilisés dans l'industrie du plastique et du papier ou autres sous-produits industriels. Ceux-ci sont omniprésents dans l'environnement et se retrouvent dispersés dans tous les milieux, à savoir l'air, l'eau et le sol. Certains sont persistants et peuvent être transportés sur de longues distances. D'autres sont rapidement dégradés, soit directement par des réactions physico-chimiques au niveau du milieu, soit par des processus dits de détoxification au sein de l'organisme. Quelques-uns aussi ont un caractère lipophile, pouvant s'accumuler dans les tissus graisseux.

Ces xénobiotiques se sont avérés actifs d'un point de vue hormonal et sont caractérisés par une extraordinaire diversité de structures chimiques (fig.2). Par exemple, les organochlorés comme les DDT, PCBs, PCDDs sont connus pour être des agents perturbateurs. Néanmoins, ces groupes exhibent de profondes différences dans leur mode d'action, leur persistance biologique et écologique. Cette diversité crée incontestablement une difficulté dans l'évaluation de la santé de l'environnement et implique un accroissement de la complexité et des coûts dans les analyses effectuées à des concentrations données sur des modèles biologiques.

Par ailleurs, il existe d'autres complications dans l'évaluation lors d'une exposition à de tels composés (Damstra *et al.*, 2002):

- a) le temps entre le contact et les effets : en effet, certains EDCs, de par leur nature sont transgénérationnels ;
- b) la saisonnalité : certaines pulvérisations de pesticides sont corrélées avec la saison de ponte ou de mise bas de certaines espèces confrontant les stades critiques de développement au polluant ;
- c) la présence dans le milieu de toute une série de substances de nature différente : un synergisme, une additivité, un antagonisme peuvent modifier les propriétés de départ du composé ;
- d) la production de métabolites toxiques à partir de composés initiaux peu toxiques.

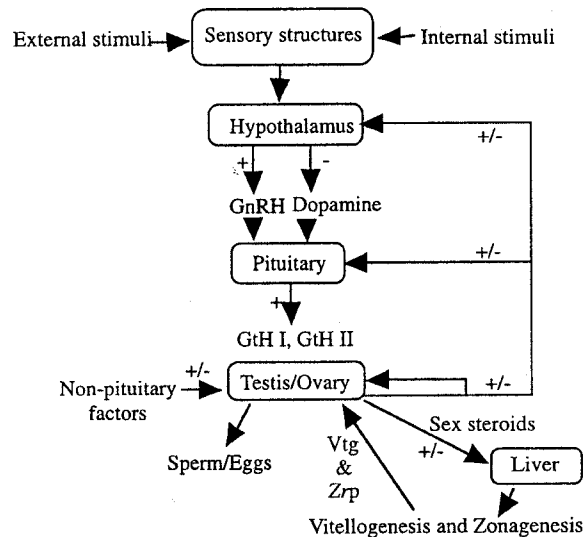


Figure 3 : Schéma du contrôle endocrinien de la reproduction montrant les facteurs ou les substances qui régulent la physiologie et les comportements du téléostéen adulte (Arukwe, 2001).

- (+) stimulation
 (-) inhibition
GnRH gonadotropin releasing hormone
GtH gonadotropin 1 et 2
Vtg vitellogénine
Zrp Zr-protein

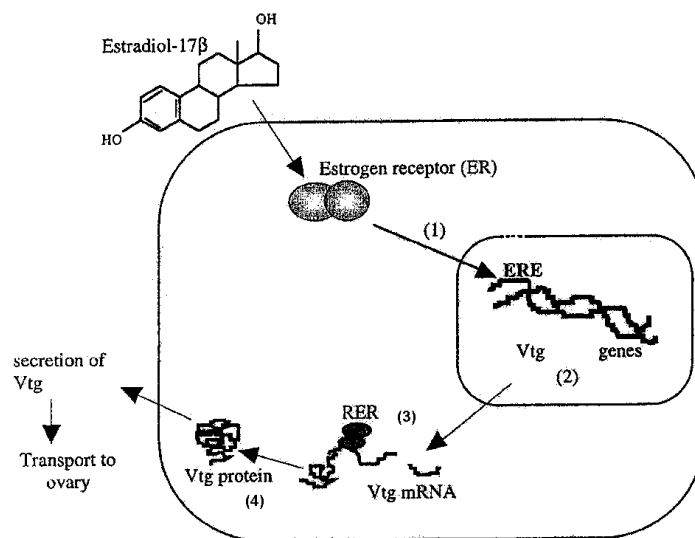


Figure 4 : Représentation de l'induction du gène de la vitéllogénine chez une femelle mature de téléostéen (Arukwe, 2001).

- 1) L'E₂ produit par l'ovaire en réponse à la GtH 1, entre dans la cellule cible et se lie avec haute affinité pour le récepteur œstrogénique.
- 2) Le complexe hormone-récepteur se lie fermement au noyau au niveau du ERE (estrogen-responsive-element) et résulte en l'activation de la transcription du gène de la vitéllogénine.
- 3) L'ARNm de la vitéllogénine est traduit en vitéllogénine.
- 4) La vitéllogénine est excrétée dans le sérum et transportée dans l'ovaire.

1.2 Contrôle endocrinien de la reproduction chez les poissons

Dans nos régions tempérées, la reproduction du poisson téléostéen suit la cyclicité saisonnière qui permet d'assurer une fraie coïncidant avec des conditions environnementales compatibles avec la survie et le développement des espèces.

Le contrôle de la reproduction est une intégration extrêmement complexe de stimuli externes à travers des signaux physiologiques internes (Crain, 1997) (fig.3).

L'hypothalamus, à travers l'influence de signaux environnementaux (photopériode, température, nutrition et facteurs sociaux), contrôle la synthèse et la libération d'hormones et de messagers chimiques résultant de la stimulation du système nerveux central (SNC). Les *gonadotropin releasing hormones* (GnRH) sont libérées à partir de l'hypothalamus et stimulent à leur tour la libération de gonadotropines (GtH) par l'hypophyse. Deux formes de GtH ont été isolées chez les téléostéens. Les GtH 1 et 2 sont analogues, respectivement, à la FSH et à la LH des mammifères. GtH 1 est impliquée dans la gamétogenèse et la stéroïdogenèse, alors que la GtH 2 est impliquée dans la maturation finale de la gamétogenèse. Généralement, les gonadotropines sont responsables de la stimulation de la synthèse des stéroïdes sexuels (androgènes, œstrogènes et progestagènes) lesquels agissent sur les tissus cibles pour réguler la gamétogenèse, la reproduction, les phénotypes sexuels et les comportements caractéristiques.

L'ovogenèse est contrôlée par la GtH 1 dans la majorité des poissons étudiés (Arukwe, 2001). Le taux de GtH 1 circulant augmente durant les premiers stades de développement de l'ovocyte et se lie aux récepteurs de la thèque et de la granulosa du follicule. Les cellules de la thèque synthétisent la testostérone et permettent ainsi l'aromatisation de ce dernier en œstradiol au niveau de la granulosa, avant sa sécrétion dans le plasma.

Par la suite, l'œstradiol plasmatique se liera aux récepteurs œstrogéniques (ER) et induira la production de vitellogénine au niveau du foie (fig.4). La vitellogénine sera libérée du foie dans le sang et sera incorporée dans l'ovocyte via un processus d'endocytose. Alors que l'ovocyte continue à grossir, le taux de GtH 1 commence à décroître et est remplacé par une augmentation des niveaux de GtH 2.

Cette cascade de réactions est communément appelée l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope (axe-HPGL). Cet axe-HPGL est contrôlé par un système de feed-back.

Chez le poisson mâle, la GtH 1 est typiquement élevée pendant toute la spermatogenèse et décroît en période de fraie. La GtH 2, elle, est faible durant la période de croissance testiculaire et élevée au moment de la fraie (Arukwe, 2001). Les gonadotropines stimulent la prolifération des spermatogonies aussi bien que la synthèse des androgènes, lesquels sont requis pour la gamétogenèse et le développement de caractères sexuels secondaires. Les androgènes sont synthétisés dans les cellules de Leydig au niveau du testicule. Les androgènes synthétisés sont la testostérone, la 11-kétotestostérone et/ou l'androsténédione.

1.3 Qu'est-ce qu'un perturbateur endocrinien ?

Le système endocrinien joue un rôle essentiel dans les processus métaboliques et dans leur régulation à court et à long terme. Il intervient notamment dans les processus de nutrition, de comportement et de reproduction. Des perturbations dans chacun de ces systèmes impliquent une sur-production ou une sous-production d'hormones, menant à une menace pour la survie.

Différentes définitions du perturbateur endocrinien ont été proposées en vue de cerner la problématique :

Kavlocks *et al.* (1996) définissent un perturbateur endocrinien comme étant un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison et l'élimination des hormones naturelles dans les compartiments du corps responsables de l'homéostasie et de la régulation des processus de développement.

Crain (1997) définit un perturbateur endocrinien comme un contaminant qui modifie de façon permanente ou temporaire la morphologie ou la physiologie d'un tissu et ce, résultant d'une exposition pendant une période sensible du développement.

Vos *et al.* (2000) définissent un perturbateur endocrinien comme étant une substance exogène ou un complexe de substances qui altère le fonctionnement du système endocrinien, et qui a pour conséquence de provoquer des effets néfastes sur la santé d'un organisme sain, sur la descendance ou encore sur la population.

1.4 Perturbations du système reproducteur

Les poissons font preuve d'un haut degré d'hétérogénéité dans leur physiologie, anatomie, comportement et écologie. Il y a près de 3000 espèces de poissons cartilagineux, 20 000 espèces de poissons osseux et quelques espèces ancestrales (lamproie et mixine). Seule une petite proportion de ces espèces ont été étudiées avec minutie. En effet, les données provenant de la littérature sont principalement dominées par des informations concernant les cyprinidés et les salmonidés.

Malgré la grande diversité d'espèces et leur adaptabilité dans des milieux très divers, certaines de leurs caractéristiques physiologiques et anatomiques contribuent à les désavantager face à une exposition aux EDCs comme, par exemple, leur respiration aquatique ou encore leur système d'osmorégulation. De plus, les caractéristiques même des branchies (le système sanguin à contre-courant, les minces couches épithéliales et une importante surface) contribuent à augmenter la prise du contaminant à partir de l'eau.

Les poissons présentent également un haut degré de diversité dans leur stratégie de reproduction (Kime, 1998). La majorité est ovipare, mais certaines espèces manifestent une ovoviviparité, ou encore une viviparité. D'autres ont comme stratégie une certaine plasticité dans le déterminisme du sexe. Cependant, il n'est pas encore connu comment cette plasticité peut être affectée par des contaminants ayant la capacité de perturber le système endocrinien.

1.4.1 Impact des perturbateurs endocriniens sur le système reproducteur mâle et femelle

1.4.1.1 Etude de base montrant la perturbation endocrinienne : Induction de la vitellogénine chez les mâles et les juvéniles

L'induction de la vitellogénine chez les poissons mâles ou les juvéniles est un des domaines les plus étudiés dans la réponse biologique des poissons soumis à une exposition à des composés œstrogéniques (Tyler et Routledge, 1998 ; Kime *et al.*, 1999). Actuellement, de nombreux cas d'induction de vitellogénine ont été décelés dans toute une série de rivières à travers l'Europe, le Japon, et l'Amérique du Nord. Le cas le plus dramatique d'un accroissement du taux de vitellogénine est l'exposition des poissons aux effluents provenant des boues d'épuration (STWs) au Royaume-Uni. Les implications de ces réponses en terme de succès de reproduction et de viabilité sont inconnus à ce jour.

Les recherches conduites par Purdom *et al.* (1994) ont révélé que les mâles de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) mis en cage dans les STWs d'Angleterre, avaient un niveau

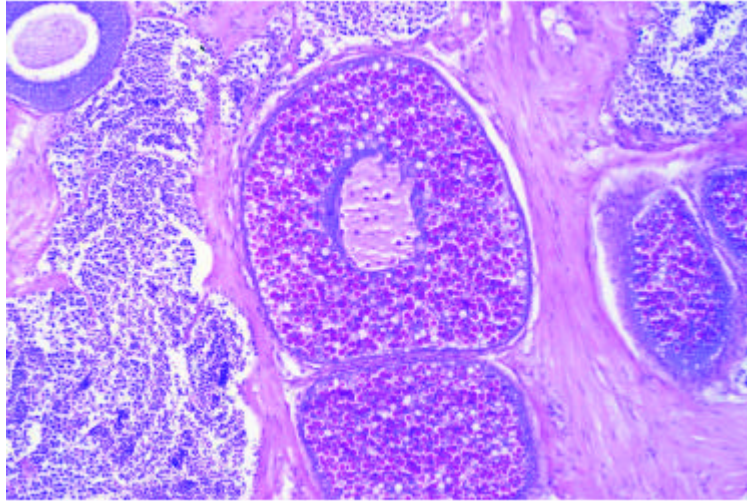


Figure 5 : Coupe histologique présentant un ovotestis chez un mâle (*Platichthys flesus*) collecté dans un estuaire au Royaume-Uni en 1996. Cette coupe montre la présence d'ovocytes au sein d'un tissu testiculaire anormal (Damstra *et al.*, 2002)

plasmatique en vtg très élevé (supérieur à 147 mg/ml). Ces valeurs sont équivalentes, voire supérieures à celles des femelles matures. Des carpes (*Cyprinus carpio*) immatures maintenues en cage ont montré les mêmes résultats. L'induction de vtg chez les poissons exposés à ce type de polluant présentent un foie élargi et une réduction de la croissance des testicules. Typiquement, le degré de vitellogenèse décline rapidement avec la distance à la source de pollution (Harries *et al.* 1999).

Des réponses similaires ont été rapportées dans différentes localités des USA chez des mâles de carpes (Bevans *et al.*, 1996 ; Folmar *et al.*, 1996 ; Goodberg *et al.*, 1997) ainsi que chez des vairons américains (*Pimephales promelas* ; Damstra *et al.*, 2002) exposés aux eaux usées municipales. Jobling *et al.* (1996) ont démontré que le nonylphénol à des concentrations environnementales (20 µg/l) était capable d'induire la production de vitellogénine et de retarder la croissance des testicules. Le nonylphénol est un produit chimique utilisé dans l'industrie plastique et est également le résultat de la dégradation partielle de certains détergents non ioniques utilisés dans les lessives et les produits détergents. Le bisphénole A a aussi été ajouté à la liste des agents œstrogéniques (Larsson *et al.*, 1999). Ce composé est utilisé en tant que monomère dans la fabrication des polycarbonates et des résines époxy entrant dans la composition du plastique.

Les effluents provenant d'usines de blanchiment de la pâte à papier (BKMEs) contiennent aussi des composés œstrogéniques qui induisent la production de vitellogénine chez les poissons exposés. Suite à une expérience réalisée en Finlande, l'expression du gène de la vitellogénine a été induite chez le corégone (*Coregonus lavaretus* L.) tenu pendant quatre semaines dans des cages recevant les effluents d'usines papetières (Mellanen *et al.*, 1999). Des études ont montré que ce type d'effluents contient des composés dérivés du bois comme des stéroïdes ou des acides résineux.

1.4.1.2 Effets sur la morphologie des testicules et des ovaires

a) Altération du développement gonadal induit par les STWs

L'inhibition de la croissance des testicules a été observée chez les adultes de truites arc-en-ciel tenus dans des eaux hautement contaminées par des composés œstrogéniques comme dans la rivière Aire (Royaume-Uni), laquelle est contaminée avec les alkylphénols (composé analogue au nonylphénol) (Harries *et al.*, 1997). Des truites exposées en laboratoire à des concentrations environnementales d'alkylphénols montrent des effets semblables sur la croissance des testicules (Jobling *et al.*, 1996). L'incidence d'un ovotestis a bien été documentée chez le goujon (*Gobio gobio*) collecté en aval des usines STWs dans plusieurs rivières du Royaume-Uni. L'ovotestis se caractérise par la présence simultanée de tissus ovariens et testiculaires. Il présente quelques ovocytes au sein d'un tissu testiculaire normal. Lors d'une contamination sévère, on retrouve une large région de tissus ovariens matures dans un tissu testiculaire anormal (Jobling *et al.*, 1998) (fig.5). Ce phénomène est causé par l'exposition des poissons à des composés œstrogéniques durant une étape critique de la gonadogenèse (Jobling *et al.*, 1998 ; Tyler et Routledge, 1998).

D'autres anomalies au niveau des testicules ont été documentées, incluant une féminisation ou l'absence du *vas deferens* et un affaiblissement de la production de sperme (Jobling *et al.*, 1998). La féminisation du *vas deferens* a été décrite chez toutes les larves de carpes mâles exposées en laboratoire au 4-*tert*-pentylphénol (Gimeno, 1997 ; Gimeno *et al.*, 1996 ; 1998).

Enfin, Batty et Lim (1999) ont montré que les mâles de gambusie (*Gambusia affinis*) pêchées en aval d'une industrie de traitement de déchets en Australie possédaient un gonopode réduit en taille, le gonopode étant une nageoire anale modifiée durant le développement sexuel servant à inséminer les femelles.



Figure 6 : Ovaires provenant du cyprin-sucet (*Catostomus commersoni*) collectés durant la période de migration.

Le poisson de gauche est issu d'une population vivant dans un lac du Canada non contaminé. Le poisson de droite provient de la baie de Jackfish, laquelle reçoit des BKMEs venant de la baie Terrace en Ontario. La taille des ovaires du poisson contaminé par les BKMEs est significativement réduite (McMaster, Munkittrick et Van Der Kraak, 1998).

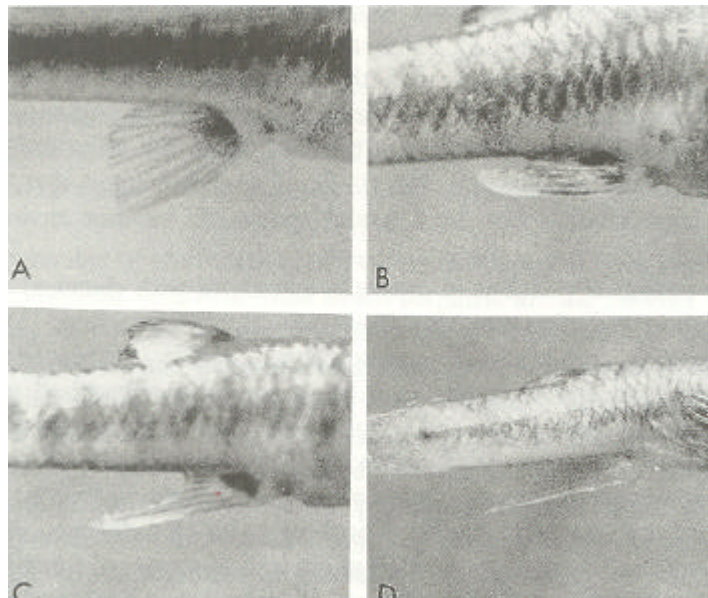


Figure 7 : Effets des BKMEs sur le développement anormal d'un gonopode chez la femelle d'*Heterandia formosa* (Kime,1998).

Les quatre photos montrent la nageoire anale :

- a) femelle normale
- b) femelle partiellement masculinisée
- c) femelle avec une masculinisation avancée
- d) mâle normal

b) Altération du développement gonadal induit par les BKMEs

Au Canada, les cyprins-sucet (*Catostomus commersoni*) collectés en aval des BKMEs exhibent un large éventail de réponses reproductives altérées, incluant une réduction de la taille des gonades, un retard dans la maturité sexuelle, une réduction dans l'expression de caractères secondaires (tubercules nuptiaux) comparés aux sites contrôles (Van Der Kraak *et al.*, 1998) (fig.6). Paradoxalement, la viabilité des œufs et du sperme ainsi que le développement des larves de ces poissons se sont avérés normaux (McMaster *et al.*, 1992). Des effets similaires ont été observés en laboratoire, utilisant le vairon américain exposé aux BKMEs (Kovacs *et al.*, 1995). Chez les perches (*Perca fluviatilis*), les mêmes problèmes ont été décelés, et il y avait en plus un affaiblissement du comportement de fraie, des œufs plus petits, un accroissement de la mortalité des larves et une réduction d'abondance (Larsson *et al.*, 1997). Les composés actifs responsables de ces anomalies chez les poissons exposés aux BKMEs n'ont pas encore été identifiés. Cependant, plusieurs composés pourraient y contribuer, comme le β -sitostérol, autres stérols, stilbènes et acides résineux (Damstra *et al.*, 2002). Une autre possibilité serait que les produits de la dégradation de certains composés énumérés plus haut aient des propriétés androgéniques (Rosa-Molinar et Williams, 1984). En effet, des effets contradictoires ont été montrés chez la femelle de gambusie (*Gambusia affinis*) en Floride. Ce poisson présentait une masculinisation au niveau de la nageoire anale, c'est-à-dire un gonopode similaire à celui trouvé chez les mâles (Bortone et Cody, 1999) (fig.7). Ceci suggère que la femelle de gambusie a été exposée à des composés androgéniques présents dans l'effluent. Il a été suggéré que les composés mimant les androgènes pouvaient soit interférer avec l'axe hypophyse-gonade ou agir de manière antagoniste sur le récepteur androgénique.

Les mécanismes sous-jacents aux effets des BKMEs sur les caractères sexuels secondaires ne sont toutefois pas encore bien compris.

c) Altération du développement gonadal induit par les pesticides

Les pesticides couvrent un large panel de polluants incluant les organochlorés, organophosphates et les carbamates.

Le DDT à une concentration de 0,001 mg/l cause des déformations au niveau des lobules séminifères, une dégénérescence des cellules germinales et des spermatocytes primaires et secondaires ainsi qu'une atrophie des cellules interstitielles du tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Cependant, ces dommages sont réversibles après 30 jours de séjour dans de l'eau propre (Bhattacharya et Pandey, 1989). Chez les femelles, le DDT à cette concentration pendant 20 jours résulte en une diminution de l'indice gonadosomatique (GSI = poids des gonades/poids corporel), une fibrogenèse et un épaississement de la tunique de l'ovaire, une destruction de sa structure avec de larges espaces entre les ovocytes (Shukla et Pandey, 1985). De plus, les ovocytes immatures développent une vacuolisation et une texture granulaire. En ce qui concerne les ovocytes matures, ils sont déformés et les réserves accumulées sont également de texture granuleuse.

Une exposition au β -hexachlorocyclohexane, une impureté provenant de l'insecticide Lindane, à une concentration de 0,32 mg/l, diminue la maturation des ovocytes, rend une formation anormale de la réserve car les gouttelettes de réserves ne fusionnent pas (Kime, 1998). Des changements au niveau du foie ont également été observés, suggérant une activité œstrogénique de cet organochloré.

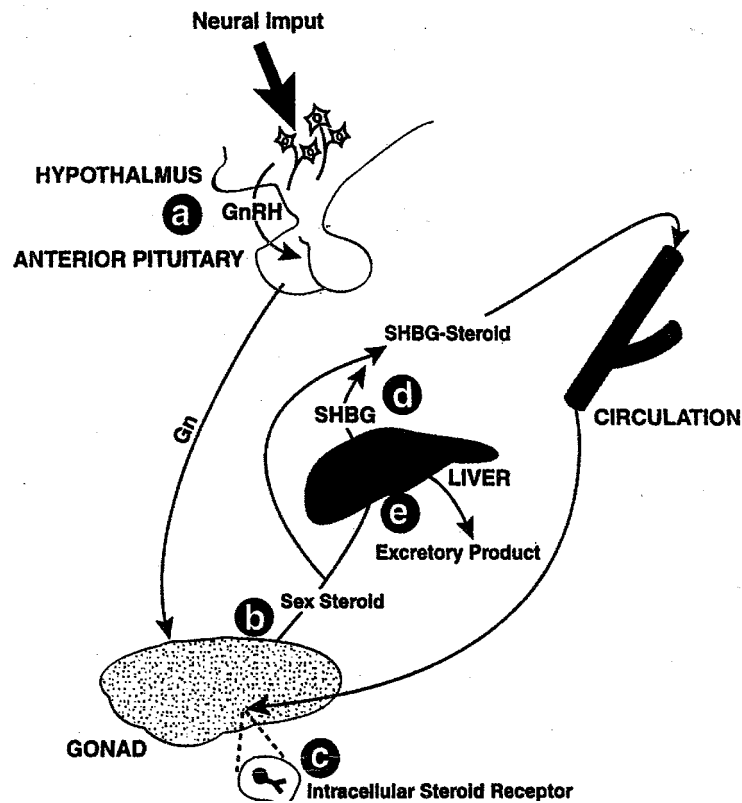


Figure 8 : Schéma général du système endocrinien de la reproduction avec les points spécifiques susceptibles d'être touchés par les perturbateurs du système endocrinien (Crain, 1997) :

- a) L'axe hypothalamo-hypophysaire
- b) La stéroïdogénèse gonadale
- c) Les récepteurs stéroïdiens
- d) La production et l'interaction avec les SHBGs
- e) Le métabolisme des stéroïdes au niveau du foie

L'insecticide Endosulfan, (0,00075 et 0,001 mg/l) produit chez le mâle du *snakehead* (*Channa punctatus*) une rupture des parois des lobes séminifères, une défaillance de la spermatogenèse au niveau du stade spermatide, une nécrose des cellules intertitielles, une fibrose du tissu conjonctif et une réduction du GSI (Arora et Kulshrestha, 1984). Chez la femelle de 'carp minnow' (*Rasbora daniconius*), l'endosulfan à une concentration de 0,001 mg/l pendant 45 jours, cause une nécrose et une fibrose du tissu conjonctif, une dilatation des vaisseaux sanguins et une réduction du diamètre ainsi que des déformations des ovocytes.

Le fenthion (organophosphate) est un autre insecticide utilisé dans les pays tropicaux dans la lutte contre les moustiques porteurs de la malaria. L'expérience a tenté de mimer le régime de pulvérisation afin de démontrer les conséquences sur le tilapia, source importante de protéines pour les populations locales. Suite à ce régime, ces poissons présentaient une diminution du GSI, une dégénérescence de l'ovaire avec une atresie totale des follicules et étaient incapables de frayer pendant au moins neuf semaines après leur retour dans de l'eau propre (Kling, 1981).

1.5 Modes d'action des perturbateurs endocriniens (EDCs)

Les recherches ont montré qu'il y a énormément de mécanismes par lesquels les EDCs peuvent interférer avec le système endocrinien et causer des effets néfastes comme présentés ci-dessus. Cependant, il y a au moins cinq mécanismes par lesquels ces derniers sont susceptibles de modifier les fonctions vitales du système endocrinien (Crain, 1997) (fig.8).

Les xénobiotiques perturbent la fonction endocrine normale en altérant :

- le contrôle endocrinien de l'axe hypothalamo-hypophysaire
- l'activité des enzymes intervenant dans la stéroïdogénèse
- le fonctionnement et la synthèse des protéines de transport des stéroïdes, comme par exemple la SHBG (*Sex Hormone-Binding Globulin*)
- l'activité des récepteurs stéroïdiens, en agissant comme agoniste ou antagoniste
- la fonction d'élimination des stéroïdes par le foie

Le mode d'action exact des perturbateurs endocriniens n'est pas encore complètement élucidé. Ceci rend difficile une distinction entre les effets directs et indirects et les effets primaires *versus* secondaires suite à une exposition aux EDCs. De plus, cela requiert une certaine prudence lors de l'extrapolation des données *in vitro* à une prédiction *in vivo*.

Malgré un manque global de connaissances sur les mécanismes d'actions des EDCs, il y a plusieurs exemples où le mécanisme est clairement décrit.

1.5.1. Interférence avec le contrôle endocrinien de l'axe hypothalamo-hypophysaire

L'hypothalamus et l'hypophyse régulent en amont le système endocrinien. Les polluants qui pourraient affecter leur fonction toucheront inévitablement l'intégralité de l'organisme. Chez un individu normal, les sécrétions hormonales produites par ces derniers sont contrôlées par un système de feed-back qui agit soit positivement, soit négativement sur le système hypothalamo-hypophysaire (fig. 3).

Peu d'études ont été réalisées à ce propos étant donné la difficulté requise lors de l'isolation du système hypothalamo-hypophysaire. Par ailleurs, il a été publié que cet axe pouvait être touché par certains composés des BKMEs. Lors de la migration de reproduction dans la baie de Jackfish (Canada), les cyprins-sucet ont été trouvés avec une fonction hypophysaire altérée. En fait, le taux plasmatique de GtH 2 était 30 à 50 fois plus bas que le niveau des

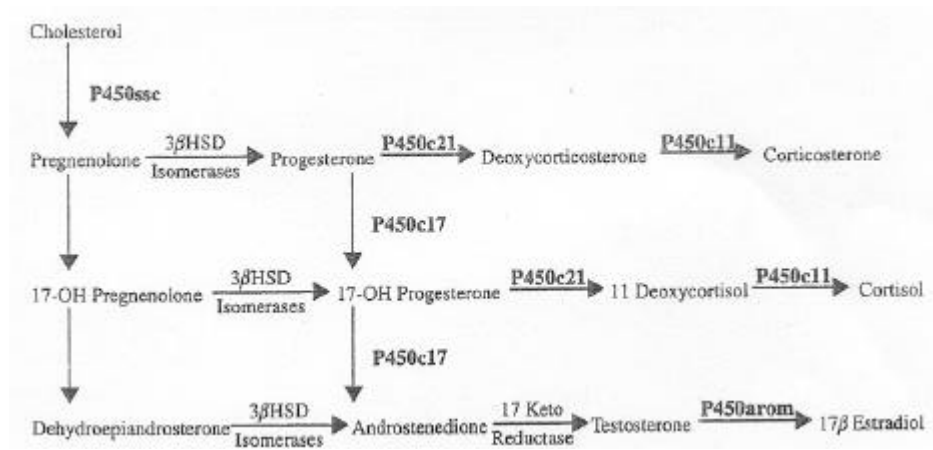


Figure 9 : Déroulement de la stéroïdogenèse illustrant les enzymes P450 menant à la production d'hormones sexuelles (Crain,1997).

P450 ssc : cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450

3βHSD : 3β-hydroxystéroïde déhydrogénase isomérase

P450c21 : P450 21a-hydroxylase

P450c11 : P450 11a-hydroxylase

P450c17 : P450 17a-hydroxylase

P450 arom : cytochrome P450 aromatase

poissons contrôles (Van Der Kraak, 1992). On ne connaît pas exactement les effets de cette élévation sur ces poissons prélevés en milieu naturel.

La β -hexachlorohexane stimule la sécrétion des gonadotropines hypophysaires (GtH) alors que le développement des testicules est retardé par la nature œstrogénique de ce composé (Wester *et al.*, 1985). Ceci montre l'effet feed-back positif des composés œstrogéniques agissant sur l'hypophyse.

1.5.2. Interférence avec les enzymes intervenant dans la stéroïdogénèse

La dynamique des hormones stéroïdiennes est guidée par un certain nombre d'enzymes qui convertissent les stéroïdes (fig.9). Le composé de départ de la stéroïdogénèse est le cholestérol. A travers différentes réactions enzymatiques, il évolue en progestagènes, androgènes et œstrogènes. L'induction, ou la répression, de gènes codant pour ces enzymes peut résulter en une altération de la production d'hormones (Crain, 1997). La plupart des enzymes intervenant dans la stéroïdogénèse sont des enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP450) et l'affinité de liaison d'un polluant pour une enzyme particulière varie de composés en composés (fig.9). En général, à concentration élevée, il n'y a pas d'inhibiteur spécifique des CYP450.

Des techniques visent à démontrer une éventuelle altération de la stéroïdogénèse, notamment en calculant l'indice gonadosomatique sur les poissons contrôlés et traités. Une diminution du GSI est le résultat d'un abaissement d'activité de l'hypothalamus ou de l'hypophyse ou encore des gonades. Idéalement, les informations sont complétées par une analyse histologique afin de déterminer quel niveau a été altéré. Une autre indication du statut gonadal est de mesurer les niveaux de stéroïdes dans le plasma du poisson. Mesurer les taux d'hormones stéroïdiennes est devenu relativement simple. On peut réaliser le dosage par ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbant Assay*), RIA (*radioimmunoassay*). Une autre technique consiste à déterminer la capacité de la gonade à produire des stéroïdes en réponse à de la GtH soit *in vitro*, soit *in vivo*. Une dernière technique consiste à incuber le tissu avec des précurseurs radiolabellés et d'identifier les produits formés (Kime, 1999).

Ainsi, les femelles du cyprin-sucet exposées aux BKMEs durant la vitellogénèse (période de développement des gonades) montrent une réduction du taux circulant d'E₂ et de testostérone (Munkittrick *et al.*, 1991 ; McMaster *et al.*, 1991). Une réduction de testostérone et de 17 α , 20 β -P a été observée durant la période de fraie (McMaster *et al.*, 1991 ; Van Der Kraak *et al.*, 1992) comparée aux niveaux de stéroïdes trouvés chez des femelles de référence. Des dépressions similaires ont été trouvées chez des mâles de cyprins-sucet. Des expériences réalisées en laboratoires sur le vairon américain exposé aux BKMEs durant tout leur cycle de vie montrent des effets semblables sur les niveaux de stéroïdes circulants (Robinson, 1994 ; Kovacs *et al.*, 1995). Ces études prouvent que les réponses de reproduction étaient associées directement à une exposition à des effluents et ne sont pas le résultat de facteurs environnementaux comme l'altération de l'habitat. Cependant, les constituants du BKME qui sont responsables de la perturbation endocrinienne n'ont pas encore été exactement identifiés.

Folmar *et al.* (1996) ont trouvé que les carpes mâles (*Cyprinus carpio*) collectées près des effluents STWs aux USA montraient une réduction du niveau de testostérone mais pas d'E₂. Après 20 jours d'exposition de *Oreochromis mossambicus* à 0,001 mg/l de DDT, l'activité de la 3 β - et de la 17 β -HSD était absente au niveau des cellules interstitielles du testicule (Bhattacharya et Pandey, 1989). Lors de l'incubation du testicule du poisson rouge mâle (*Carassius auratus*) avec 0,01 mg/l de γ -HCH pendant quatre semaines (Singh *et al.*, 1994), la testostérone et la 11-kétotestostérone étaient significativement diminuées. La production de

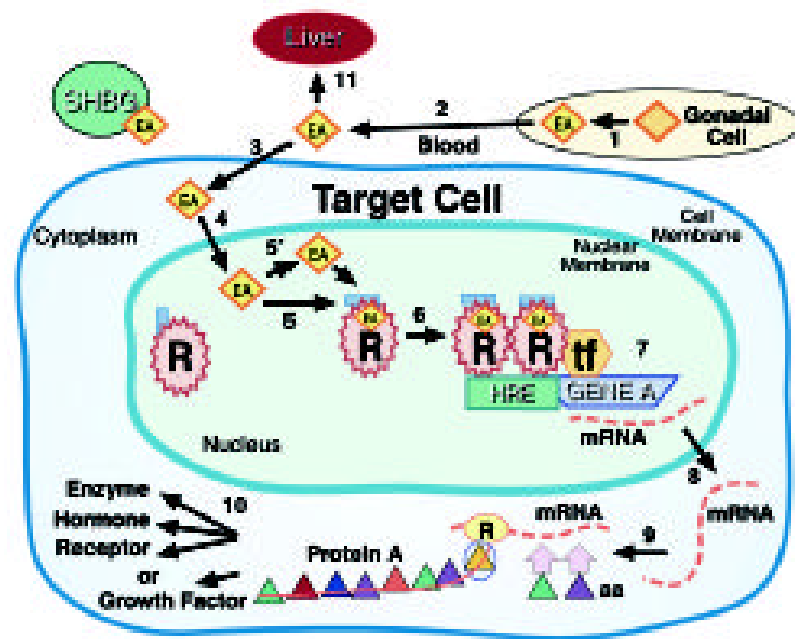


Figure 10 : Schéma décrivant les étapes clés de l'action des hormones stéroïdiennes, chaque niveau pouvant être touché par des xénobiotiques (Damstra *et al.*, 2002).

- 1) Les hormones stéroïdiennes comme l'E₂, la testostérone et la progestérone sont synthétisées par les cellules gonadales. Les inhibiteurs des enzymes CYP450 incluant les drogues et les pesticides, agissent ici.
- 2) Les hormones sont excrétées dans le sang à partir des gonades et sont disponibles pour les cellules soit par simple diffusion, soit liées par les SHBGs. Les toxiques sont capables d'altérer le taux de SHBGs. De plus, il a été montré que certains EDCs ne s'y liaient pas, les rendant disponibles pour une cellule cible ou encore pour la métabolisation au niveau du foie.
- 3) Le stéroïde diffuse à l'intérieur de la cellule.
- 4) L'hormone diffuse vers la région périnucléaire, où se trouve le récepteur inoccupé.
- 5) L'hormone ou l'EDC se lie au récepteur.
- 5') L'hormone excrétée dans le sang peut être sous la forme d'une prohormone laquelle sera métabolisée dans la cellule.
- 6) Le récepteur lié au ligand naturel ou synthétique provoque un changement conformationnel et forme un hétérodimère.
- 7) L'hétérodimère accumule des facteurs de transcriptions, formant un complexe transcriptionnel qui se lie à une séquence particulière d'ADN (hormone-dependent gene) appelé HRE (hormone response element). Le complexe initie la synthèse de l'ARNm. Certains EDCs sont capables d'interférer avec l'ADN.
- 8) l'ARNm est transporté dans le cytoplasme.
- 9) Traduction de l'ARNm en une séquence particulière d'acides aminés.
- 10) La protéine, marqueur de l'activité endocrine, peut être une enzyme, une hormone, un facteur de croissance, ou encore un composé structural de la cellule.
- 11) Dans certains cas, les toxiques perturbent la fonction endocrine en altérant la fonction du foie, soit en augmentant, soit en diminuant le métabolisme des stéroïdes

11-déoxycortisol était par contre augmentée, ce qui suggère une inhibition de la synthèse des androgènes.

Une altération de la production de stéroïdes peut se traduire en un développement anormal de gamètes et donc affecter la viabilité de la descendance. En effet, le développement normal des gamètes requiert un modèle temporel précis de sécrétion hormonale. En temps normal, des signaux permettent d'indiquer que les gamètes ont atteint un niveau suffisant de maturation et permettent de stopper la production de stéroïdes (Kime, 1999).

1.5.3. Interférence avec les protéines de transport

La SHBG est produite par le foie. Elle protège les hormones stéroïdiennes de la dégradation par le foie et aide l'hormone à atteindre l'organe cible. Lorsque celle-ci est attachée au SHBG, l'hormone est biologiquement inactive.

Peu d'études ont été réalisées sur l'impact des EDCs sur la fonction des SHBGs. Cependant, il a été prouvé que les composés antiœstrogéniques augmentaient la concentration plasmatique de SHBG. Cette augmentation cause une élévation d'hormones biologiquement inactive qui, dès lors, diminuent la quantité d'hormones stéroïdiennes qui atteindront le récepteur cible (Crain, 1997).

1.5.4. Interférence avec l'activité des récepteurs hormonaux : agonisme, antagonisme

Le mécanisme le plus étudié est sans conteste l'impact des EDCs sur les récepteurs hormonaux (fig. 10). Les réponses médiées par le récepteur incluent la liaison de l'hormone au récepteur qui se trouve au niveau de la surface cellulaire, du cytoplasme, ou encore du noyau. Des expériences *in vitro* ont montré que certains EDCs ont la capacité de se lier sur les récepteurs œstrogéniques, androgéniques ou encore sur le AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) (tableau 1). De plus, il apparaît que ces interactions induisent différents modes de réponses. Les quelques exemples ci-après tentent d'illustrer que certains xénobiotiques agissent en se liant au récepteur œstrogénique, androgénique ou sur le AhR.

Le nonylphénol, composé analogue à l'œstradiol, interagit avec les mêmes parties du domaine de liaison ligand-récepteur au niveau des hépatocytes de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Madigou *et al.* 2001). Celui-ci est alors capable d'induire la transcription du gène de la vitellogénine mais à des concentrations beaucoup plus élevées que celles de l'œstradiol (Petit *et al.*, 1997).

L'octylphénol, le bisphénol A, l'*o,p'*-DDT, le diéthylstilbestrole, l'éthynyl œstradiol sont considérés comme étant des composés qui agissent en ce sens. La conséquence de cette interaction, montrée *in vivo*, est une induction du gène de la vitellogénine chez les mâles et les juvéniles.

Les études de Kelce *et al.*, 1995 ont montré que le *pp'*-DDE inhibe la liaison des androgènes sur le récepteur androgénique. La liaison des androgènes sur leurs récepteurs induit une activité transcriptionnelle et permet le développement normal des caractéristiques mâles. Les études conduites par Danzo (1997) ont montré que le *pp'*-DDE est le plus puissant des xénobiotiques testés à inhiber la liaison du 5 α -DHT avec le récepteur androgénique. Les mêmes résultats ont été trouvés pour le hexachlorocyclohexane. *In vivo*, le traitement au pesticide vinclozolin induit des cas d'intersexualité chez le medaka (*Oryzias latipes*) (Koger

Tableau 1 : Présentation de composés ayant la capacité de se fixer sur un type particulier de récepteurs (traduit d'après Indarto et Izawa, 2001).

Composé	Utilisation	Récepteur
DES	Medecine	ER α , ER β
Bisphenol A		ER α , ER β
Nonylphenol		ER α , ER β
PAHs : HCB, HCH <i>o,p'</i> -DDT <i>p,p'</i> -DDT Methoxychlor Endosulfan Chlordecone <i>p,p'</i> -DDE Linuron Vinclozolin Procymidone	Pesticide	AhR ER α , ER β ER α , ER β ER α , ER β ER α , ER β ER α , ER β AR AR AR AR
PCBs Bisphenol A 4-Tert-octyphenol 4-Octyphenol TCDD	Déchet industriel	ER α , ER β ER α , ER β ER α , ER β ER α , ER β AhR

AhR, aryl hydrocarbon receptor; AR, androgen receptor; DES, diethylstilbestrol; ER, estrogenreceptor; HCB, hexachlorobenzene; HCH, hexachlorohexane; *o,p'*/*p,p'*-DDT, dichloro-diphenyltrichloroethane; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon; PCB, polychlorinated hydroxybiphenyl; *p,p'*-DDE, 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chloro-phenyl)ethylene; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.

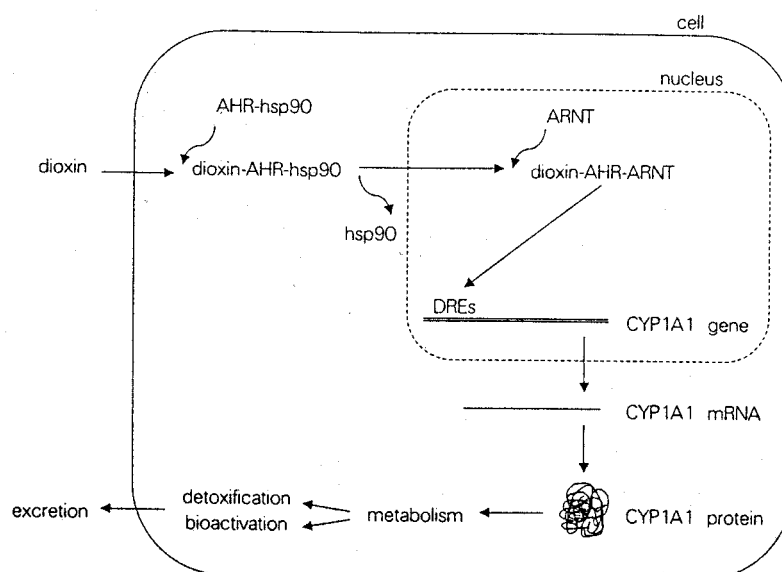


Figure 11 : Schéma illustrant la DRE (*Dioxin Response Element*) (Balm, 1999).

Pour exemple, la dioxine diffuse passivement à travers la membrane plasmique et se lie au AhR, lequel est transformé en une forme active. L'activation du AhR implique la dissociation du hsp90 dans le cytosol et il y a formation d'un hétérodimère entre l'AhR et l'ARNT dans le noyau. Le complexe dioxine-AhR-ARNT induit la DRE qui initie la transcription du gène CYP1A1. Il y a ensuite métabolisation qui facilite l'excrétion en dehors de la cellule.

et al., 1999). Sperry et Thomas (1999) ont montré l'antagonisme de ce pesticide et de ses métabolites en se liant au récepteur androgénique.

En ce qui concerne le AhR, récepteur cytosolique, il est impliqué dans l'expression de certains gènes de la phase I et de la phase II. Le AhR est aussi impliqué dans la régulation de gènes qui codent pour des protéines intervenant dans le contrôle de la croissance cellulaire. Ce récepteur se trouve, normalement, sous forme inactive dans le cytosol. Le complexe ligand-AhR- ARNT active une réponse spécifique appelée DRE (*Dioxin Response Element*) (fig.11). Un ligand endogène n'a pas encore été découvert. Par ailleurs, tous les effets du TCDD sont médiés à travers le AhR (Okey *et al.*, 1994 ; Hankinson, 1995). Certains pesticides, l'acide arachidonique, la caféine, les PAHs, les caroténoïdes, les flavonoïdes, des dérivés d'indoles sont des substrats qui induisent la réponse DRE (Balm, 1999).

1.5.5. Interférence avec l'élimination des stéroïdes

Une des fonctions hépatiques est de convertir les stéroïdes en composés plus hydrophiles. Une altération du taux d'excrétion des hormones stéroïdiennes pourra affecter le profil hormonal d'un individu. Il a été montré que certains polluants causaient de telles altérations. De plus, il est reconnu depuis longtemps que le foie est le siège du métabolisme des xénobiotiques (Crain, 1997).

Des études ont montré que l'administration de malathion ou encore de parathion inhibait l'hydroxylation de la testostérone au niveau du foie chez le rat. Par contre, le DDT ainsi que le chlordane stimulent l'hydroxylation des stéroïdes (Crain, 1997).

2. Cytochrome P450 aromatase ou le gène *CYP19*

2.1 Superfamille des cytochromes P450s

La superfamille des gènes P450s est extrêmement large, elle contient 480 membres répartis dans 74 familles. Les cytochromes P450s (*CYP*) sont exploités par beaucoup d'organismes dans la biosynthèse de composés endogènes comme les stéroïdes, les acides gras, les prostaglandines, les amines biogènes et les phéromones. Cependant, bon nombre de composés exogènes se sont révélés être le substrat du P450, comme les drogues, les métabolites des plantes ainsi que différents polluants. Ces composés étrangers sont alors métabolisés par les enzymes du cytochrome P450 et sont éliminés beaucoup plus facilement par l'organisme. Toutefois, la métabolisation de ces composés ne conduit pas toujours à une détoxification. Dans certains cas, l'oxydation ou la réduction de ces produits initie la formation de composés carcinogènes, mutagènes ou encore tératogènes (Ioannides, 1996).

2.1.1 Réactions de biotransformation

D'une manière générale, la biotransformation est la conversion des xénobiotiques lipophiles en composés hydrophiles et ceci, a pour conséquences:

- 1) de réduire la demi-vie biologique du xénobiotique
- 2) de réduire la durée d'exposition au xénobiotique
- 3) d'éviter l'accumulation du xénobiotique au sein de l'organisme
- 4) de changer la durée de l'activité biologique du xénobiotique




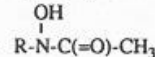

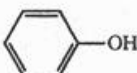
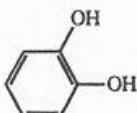
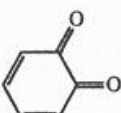
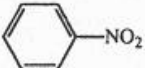
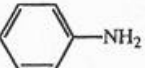
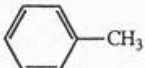
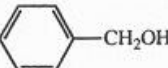
Type of reaction	Example	
MONOOXYGENASE ACTIVITY		
Hydroxylation	$R-CH_2-CH_3$	$\longrightarrow R-CHOH-CH_3$
Epoxidation		\longrightarrow 
	$R_2C=CR_2$	\longrightarrow 
N-hydroxylation	$R-NH-C(=O)-CH_3$	\longrightarrow 
O-dealkylation	$R-O-CH_3$	$\longrightarrow R-OH + CH_2O$
OXIDASE ACTIVITY		
Aromatic hydroxylation		$\xrightarrow{\cdot OH}$ 
Ethanol oxidation	CH_3-CH_2-OH	$\xrightarrow{\cdot OH}$ $CH_3-CH=O$
Catechol oxidation		$\xrightarrow{O_2^{\cdot -}}$ 
REDUCTASE ACTIVITY		
Azo reduction	$R-N=N-R'$	$\longrightarrow R-NH_2 + R'-NH_2$
Nitro reduction		\longrightarrow 
Reductive dehalogenation	CCl_4	$\longrightarrow CHCl_3 + HCl$
PEROXYGENASE ACTIVITY		
Toluene hydroxylation		\xrightarrow{XOOH} 

Figure 12 : exemples de réactions de biotransformation résultant de différentes activités catalytiques perpétrées par le cytochrome P450 (Ioannides, 1996)

Le foie est l'organe le plus important dans les processus de biotransformation, un processus qui peut être divisé en trois phases : la phase I, la phase II et la phase III.

Phase I

Les réactions métaboliques de la phase I incluent des réactions de réduction, d'oxydation et d'hydrolyse. Ces réactions révèlent ou introduisent des groupes fonctionnels ou réactifs au sein d'une molécule endogène ou exogène et ce, pour la rendre plus hydrophile.

Phase II

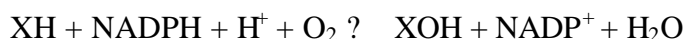
Les réactions de la phase II sont des réactions de conjugaison, soit directement sur le xénobiotique, soit sur un métabolite issu de la phase I avec, par exemple, un sulfate inorganique, des amino-acides, l'acide glucuronique ou encore avec le glutathion. Les réactions de conjugaison facilitent le transport et augmentent l'élimination à travers les voies rénales et biliaires.

Phase III

Les réactions de la phase III sont considérées comme la métabolisation des produits dérivés de la phase II. Ces réactions sont catalysées par des enzymes qui sont aussi actives dans la phase I et II. La phase III diffère des deux premières par le fait que les substrats proviennent des réactions de métabolisation induites par les phases I et II.

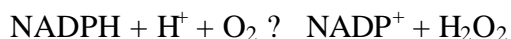
2.1.2 Le cytochrome P450

Le plus important système catalysant les réactions métaboliques de la phase I est le cytochrome P450. Le système P450 est impliqué dans une variété de processus permettant la métabolisation d'endobiotiques et de xénobiotiques. La première activité est communément appelée l'activité monooxygénase. En présence d'O₂ et de NADPH, un composé chimique inerte peut subir une hydroxylation, une époxidation, une N-, O-, S-déalkylation, une déamination, une sulfoxydation, une désulfuration et enfin une déhalogénéation. Ces réactions sont du type :



La deuxième activité du système P450 est une activité dite oxydase. Ce genre de réaction implique le transfert d'électrons du P450 réduit sur une molécule d'oxygène, ceci coïncide avec la formation d'un anion radical superoxyde (O₂⁻) et à un peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

L'équation générale est :



La troisième activité du cytochrome P450 est une activité réductase. Cette réaction peut être facilement réalisée sous condition anaérobie et permet le transfert d'électrons sur un substrat réductible. Les réactions de réduction se passent plus efficacement sous une faible tension en O₂ et en présence de NADPH.

Finalement, les enzymes du P450 peuvent avoir une fonction de peroxygénase.

Les différents types de réactions perpétrées par le cytochrome P450 sont illustrés à la figure 12.

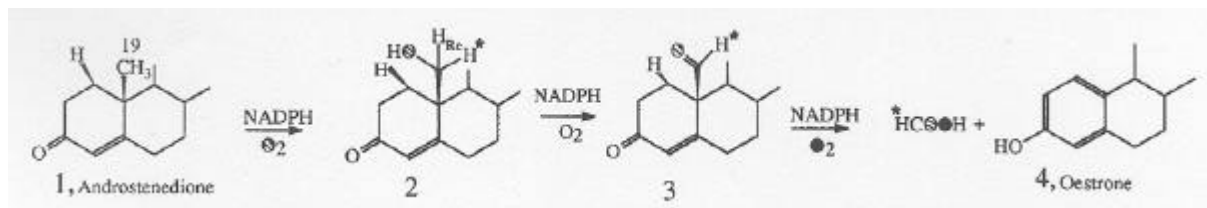


Figure 13 : Schéma de la biosynthèse des œstrogènes
(Akhtar *et al.*, 1997).

La classification des P450s est basée sur le fait de savoir s'ils ont ou non une activité métabolique sur des composés exogènes ou endogènes. Par exemple, les cytochromes P450 des familles 11, 17, 19 et 21 sont impliqués dans le métabolisme des stéroïdes.

2.2 L'aromatase ou le gène *CYP19*

Chez les mâles comme chez les femelles, les œstrogènes coordonnent les réponses au niveau du développement, de la physiologie et du comportement qui sont essentielles pour la reproduction. La conversion des androgènes C_{19} en œstrogènes C_{18} est catalysée par la P450 aromatase, produit issu du gène *CYP19*. Cette conversion se produit par une aromatisation des stéroïdes sexuels C_{19} . Le complexe enzymatique est composé de l'aromatase cytochrome P450 et de la flavoprotéine NADPH-cytochrome P450 réductase. Cette réaction prend place au niveau du réticulum endoplasmique, utilisant trois molécules d'oxygène et trois molécules de NADPH pour chaque molécule d'œstrogène produit. Une molécule d'eau est également libérée (Tong *et al.*, 2001). Les œstrogènes ainsi générés vont se lier à des récepteurs nucléaires spécifiques. Ils agissent, alors, comme des facteurs de transcription. La réaction d'aromatisation est présentée à la figure 13.

Chez l'homme, beaucoup de tissus sont capables d'exprimer l'aromatase et donc de synthétiser des œstrogènes. Ces tissus incluent les ovaires et les testicules, le placenta, le foie du fœtus (mais pas de l'adulte), le tissu adipeux, les chondrocytes et les ostéoblastes du tissu osseux, dans certaines parties du cerveau incluant l'hypothalamus, le système limbique et le cortex cérébral (Simpson *et al.*, 2002). Par ailleurs, la biosynthèse des œstrogènes semble se produire à travers tous les *phyla* de vertébrés : mammifères, oiseaux, reptiles, amphibiens, téléostéens, élamobranches et agnathes (mixine et lamproie). Ce gène a également été décrit chez le protochordé *Amphioxus*. Toutefois, l'état actuel des connaissances n'a démontré aucune synthèse d'œstrogènes chez les animaux appartenant au *phylum* des non chordés, bien que le gène P450 aromatase semble être un produit d'une ancienne lignée de P450 ayant divergé il y a un milliard d'années (Simpson *et al.*, 2002).

Chez la plupart des espèces de vertébrés qui ont été examinées, l'aromatase est exprimée au niveau des gonades et du cerveau. Chez beaucoup d'espèces, la synthèse d'œstrogènes dans le cerveau est impliquée dans les comportements liés au sexe, comme les réponses d'accouplement ou encore dans les différences marquées du dimorphisme sexuel.

L'analyse de la structure du gène a été réalisée chez de nombreux mammifères et espèces de poissons. Les espèces les plus étudiées sont sans conteste le poisson rouge (*Carassius auratus*) et le 'zebrafish' (*Danio rerio*). Ces derniers contiennent deux isoformes distinctes de l'aromatase, une présente dans le cerveau, l'autre dans les gonades. Ces deux isoformes ont une programmation et une régulation différente durant l'embryogenèse. Ces deux isoformes sont le produit de gènes séparés et ont approximativement 60% d'homologie indiquant leur séparation dans l'échelle évolutive. D'autre part, l'homologie des séquences entre le poisson rouge et le zebrafish correspondant aux isoformes A et B est de 88%.

2.2.1 Arbre phylogénétique de la protéine P450arom

Les études de Callard et Tchoudakova (1997) ont tenté de retracer l'échelle phylogénétique de ce gène afin d'en retrouver l'hypothétique ancêtre.

La figure 14 est la représentation d'un diagramme simplifié de l'arbre phylogénétique des vertébrés, soulevant les points clés dans l'évolution de l'apparition du gène de l'aromatase au niveau des gonades et du cerveau.

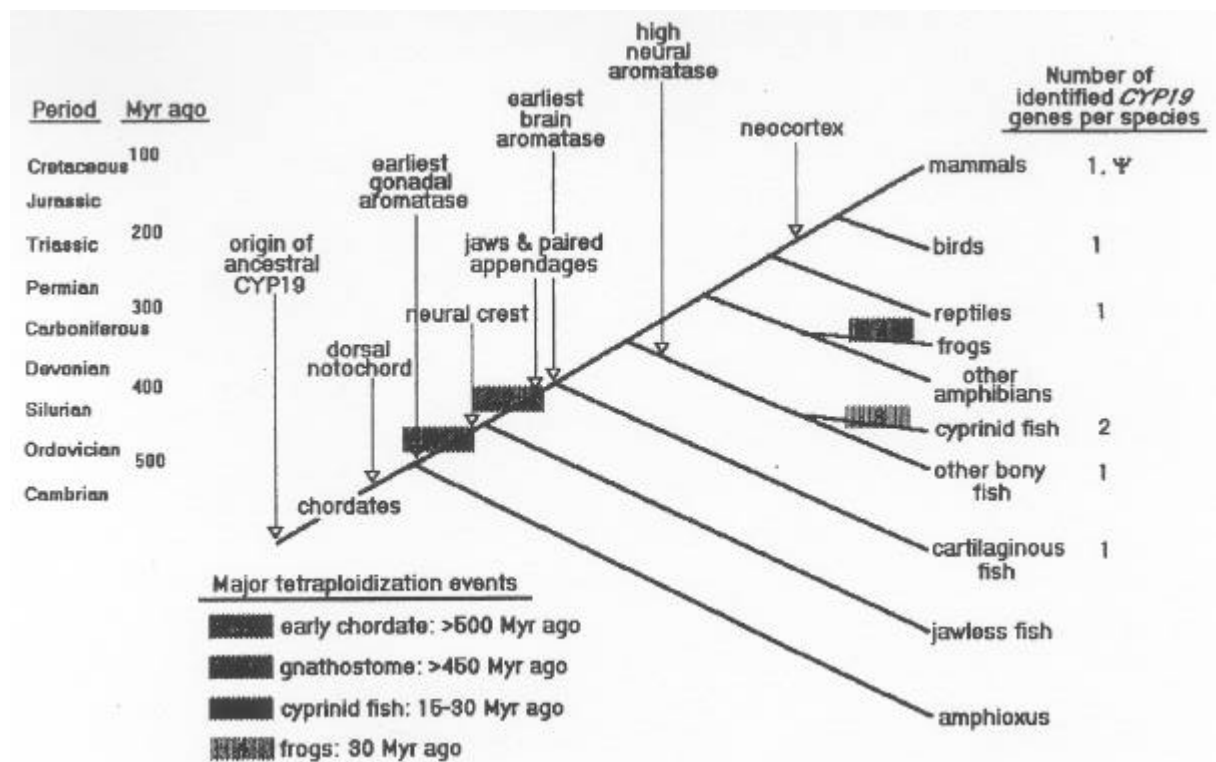


Figure 14 : Diagramme de l'arbre phylogénétique des vertébrés. L'histoire de l'évolution du couple CYP19/P450 aromatase est basée sur des études comparatives (Callard *et al.*, 1996).

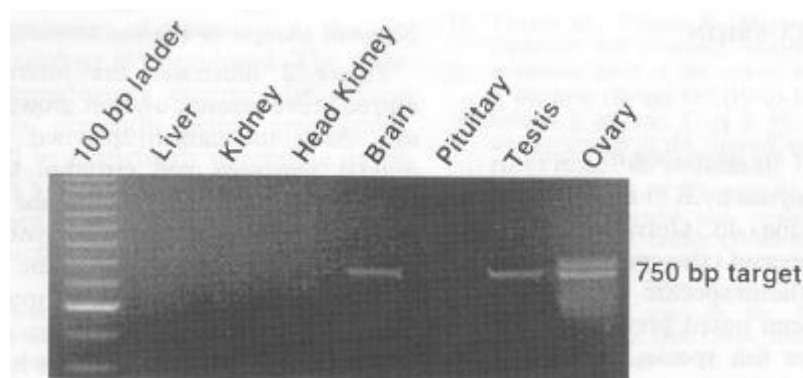


Figure 15 : Visualisation d'un produit RT-PCR de l'expression de transcrits de l'aromatase au sein de différents tissus chez le téléostéen *Channel Catfish* (*Ictalurus punctatus*) (Trant *et al.*, 1997). Dans les différents tissus testés, seule le cerveau et les gonades possèdent des transcrits de l'aromatase.

L'amphioxus semble être la plus ancienne espèce connue à ce jour à pouvoir aromatiser les androgènes en œstrogènes au niveau des gonades (testicules et ovaires). Cette caractéristique se conserve tout au long de l'évolution. Alors que l'amphioxus ne possède pas de cerveau bien défini, une activité de l'aromatase commence à être identifiée au niveau du cerveau chez les poissons sans mâchoire (mixine, lamproie) mais démontrée avec certitude chez les poissons cartilagineux (requins), les amphibiens, les reptiles et les oiseaux. On estime que l'ancêtre du gène P450 est apparu il y a 1500 millions d'années. La famille représentée par le *CYP19* a divergé approximativement il y a 900 millions d'années. Par ailleurs, la présence du P450 dans les gonades daterait de 500 millions d'années et sa présence dans le cerveau daterait d'approximativement 400 millions d'années.

2.2.2 Evidence de deux gènes *CYP19* fonctionnels chez les téléostéens

Les téléostéens sont caractérisés par la présence de deux gènes fonctionnels distincts (Fig. 15). Le *CYP19b* encode l'isoforme P450aromB au niveau du cerveau, de la rétine et de l'hypophyse. Le *CYP19a* encode l'isoforme P450aromA dans les gonades. Comme annoncé plus haut, la capacité du cerveau à synthétiser des œstrogènes est une caractéristique relativement ancienne et conservée tout au long de l'évolution des vertébrés. Cependant, de toutes les espèces examinées, les téléostéens sont remarquables pour leur niveau d'expression d'aromatase neural exceptionnellement élevé. Par exemple, chez l'adulte du poisson rouge, le taux d'aromatase au niveau de l'HPOA (aire préoptique) est 100 à 1000 fois supérieur à celui des régions correspondantes chez le cerveau du rat, de la souris, du hamster et de l'humain qu'ils soient jeunes ou adultes. Bien qu'il soit concentré dans l'HPOA, le niveau d'expression de P450arom est également élevé au niveau du télencéphale et est juste au-dessus de la limite détectable dans le cerveau moyen (*midbrain*), l'avant du cerveau (*hindbrain*), et la colonne vertébrale. (Callard *et al.*, 2001). La signification fonctionnelle de la synthèse d'œstrogène neuronal et la pression de l'évolution pour le maintien de ce phénomène chez tous les téléostéens examinés jusqu'à présent restent encore incomprises. Une hypothèse plausible est que l'importante biosynthèse de neuroœstrogènes a un rapport avec une extraordinaire neuroplasticité et un potentiel régénératoire du SNC chez le téléostéen adulte. Par exemple, la rétine du poisson rouge continue d'ajouter des nouvelles cellules tout au long de sa vie. De plus, si l'on induit une lésion du nerf optique il ne suffit que d'un mois pour qu'il y ait croissance des RGC (cellules du ganglion rétinien), lesquelles restaurent la vision.

2.2.3 Expression du *CYP19* durant la phase embryogénique

Vu que la biosynthèse des neuroœstrogènes est importante dans les processus de base de la neurogenèse chez les téléostéens adultes, Callard *et al.* (2001) ont émis l'hypothèse que P450aromB est la première isoforme à être exprimée dans les premiers stades de développement.

La figure 16 tente d'illustrer l'explication ci-dessous à savoir, l'évolution de l'expression du gène *CYP19* au cours de l'embryogenèse du 'zebrafish' (*Danio rerio*).

Chez le *zebrafish*, les deux variants de P450arom sont détectables dans les œufs non fécondés ainsi qu'au moment de la fécondation et à 1,5 heure de post-fertilisation (hpf) (niveau de 16 cellules). Par la suite, le signal de détection décroît progressivement d'intensité aux alentours de 12 hpf (période de la gastrulation). Cette étape coïncide avec le transfert et la dégradation d'ARNm maternel. La transcription zygotique commence à 3 hpf chez le *zebrafish*, puis, on observe une augmentation des deux isoformes entre 12 et 24 hpf, période de segmentation. La segmentation est caractérisée par une expansion, une morphogenèse et une différenciation

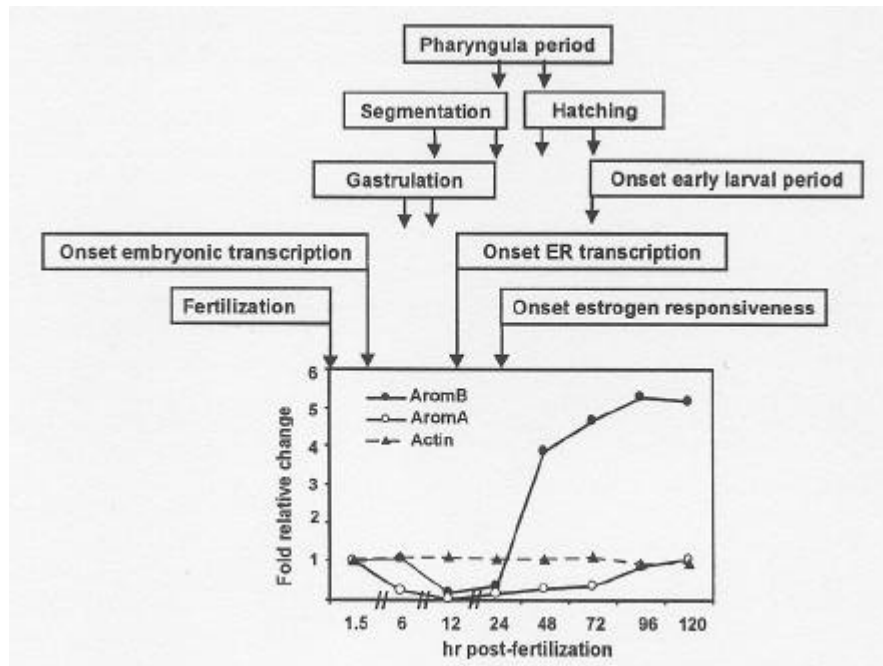


Figure 16 : Expression du gène *CYP19* au cours du temps lors de l'embryogenèse chez zebrafish (Callard *et al.*, 2001).

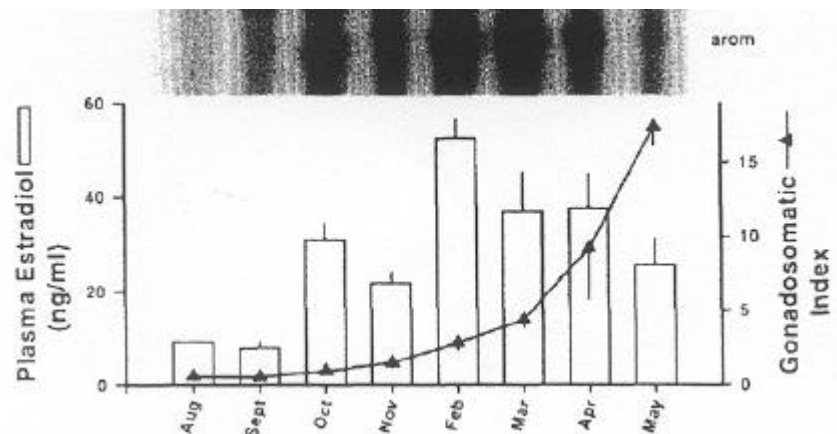


Figure 17 : Changements saisonniers au niveau de la taille relative de l'ovaire du *Channel catfish* (*Ictalurus punctatus*) (indice gonadosomatique), les concentrations plasmatiques en œstradiol et l'abondance des transcrits de l'aromatase (Trant *et al.*, 1997).

cellulaire du développement du SNC. Au même moment, les cellules germinales primordiales complètent leur migration vers leur destination finale au niveau du mésoderme où il y a formation présumée des crêtes gonadales. L'ARNm de P450aromB et de P450aromA s'accumulent progressivement durant l'embryogenèse et pendant les premières périodes larvaires (24-120 hpf). Cette accumulation est corrélée avec le développement du SNC et des gonades. Bien qu'il y ait accumulation des deux isoformes, des différences dans leur abondance relative sont observables. En effet, l'ARNm de P450aromB est en tout point toujours plus important que l'isoforme A. Quand on compare l'intensité du signal à 12 hpf, P450aromB est caractérisé par une abrupte chute. A 48 hpf l'intensité est 11 fois plus importante qu'à 24 hpf et à 120 hpf elle est 15 fois plus intense. En ce qui concerne P450aromA, l'intensité du signal est beaucoup plus graduelle, et à 120 hpf, l'intensité n'est augmentée que de 7 fois par rapport à 24 hpf.

Il n'a pas encore été déterminé si l'expression des deux isoformes de P450arom chez l'embryon est principalement endogène, comme chez l'adulte, ou si c'est à partir d'une origine extra embryogénique, comme chez les mammifères.

2.3 Variations saisonnières de l'expression de l'aromatase au niveau de l'ovaire et du cerveau

2.3.1 Variations saisonnières au niveau de l'ovaire

Ce point va traiter des changements plasmatiques en œstradiol, la croissance des ovocytes et l'expression de l'aromatase ovarienne tout au long d'une saison de reproduction chez le poisson chat américain (*Ictalurus punctatus*), (Trant *et al.*, 1997) (Fig. 17).

Après la fraie du poisson chat en mai, l'ovaire régresse rapidement et la synthèse d'œstradiol est à son niveau le plus bas. Ceci coïncide avec une absence de transcrits d'aromatase. Pendant les mois d'automne, il y a une augmentation de la synthèse d'œstradiol qui correspond avec la recrudescence ovarienne et la présence de transcrits de l'aromatase. L'élévation de stéroïdes sexuels durant cette période initie la prolifération des ovogonies ainsi que les premiers stades de développement des ovocytes. Le taux de croissance ovarienne est à son plus haut niveau au printemps. Cette rapide augmentation en taille est principalement causée par la séquestration de vitellogénine hépatique par les ovocytes de l'ovaire. Bien que les transcrits d'aromatase ne soient pas détectables durant l'été, un niveau significatif d'œstradiol plasmatique est maintenu à une concentration de 5-10 ng/ml. Il est présumé, mais pas vérifié, que l'activité de l'aromatase ovarienne est extrêmement faible, voire indétectable, à cette période de l'année. Dès lors, l'expression de l'aromatase extra-gonadale pourrait être la cause du maintien du niveau d'œstradiol plasmatique durant les mois où l'expression de ce gène par l'ovaire est diminuée. La signification biologique de la présence d'œstradiol à cette période n'est pas encore connue. Il semble donc que les changements plasmatiques en œstradiol soient corrélés à l'expression de l'aromatase au niveau de l'ovaire. Cependant, l'importance de l'expression de l'aromatase extra-gonadale dans la physiologie reproductive des poissons est encore assez vague.

2.3.2 Variations saisonnières au niveau du cerveau

L'étude de Gelinas *et al.* (1998) montre la régulation physiologique de l'expression de l'aromatase spécifique du cerveau au cours d'une saison de reproduction chez le poisson rouge. (Fig. 18)

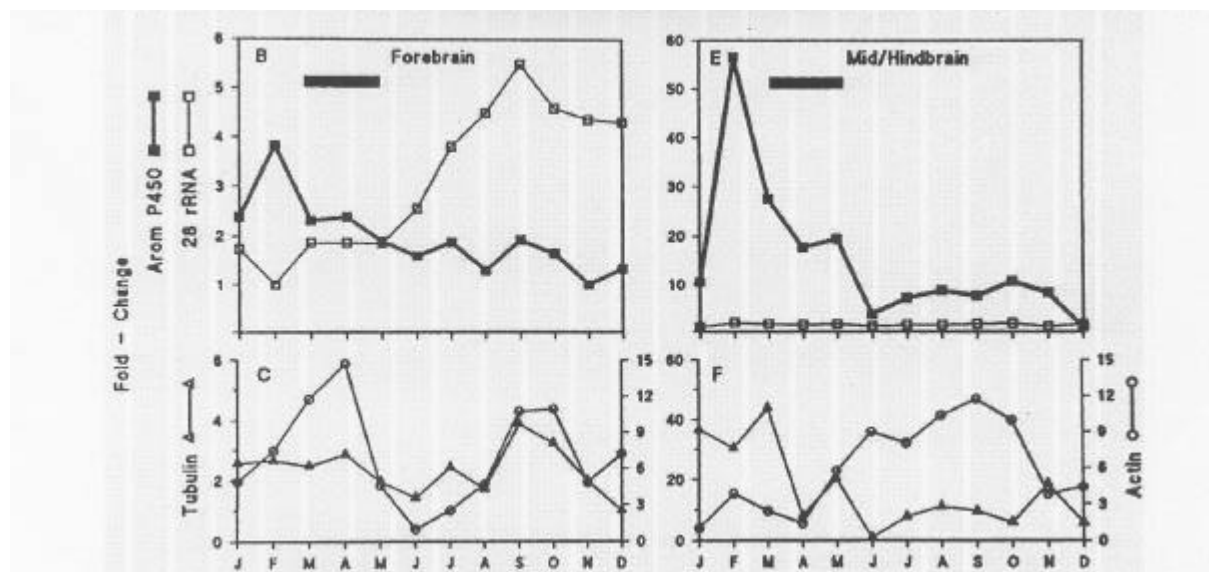


Figure 18 : Changements saisonniers de P450arom au niveau du cerveau du poisson doré. L'ARNm de la β -actine et de la β -tubuline sont des gènes utilisés comme contrôle de l'expression. L'ARNr de 28s est utilisé comme contrôle de la qualité de l'ARN (Gelinas *et al.*,1998).

En plus de la présence d'un niveau élevé d'ARNm de P450aromB et d'une importante activité enzymatique au niveau du cerveau de l'adulte du poisson rouge, il y a plus de 5 variations saisonnières (Tchoudakova *et al.*, 2001).

Le pic saisonnier d'ARNm du P450aromB à l'avant du cerveau (FB) a lieu en février, lors du début de la croissance gonadale annuelle. A ce moment, l'activité enzymatique au niveau du cerveau est juste détectable. Ensuite, l'ARNm décline à mesure que le niveau d'enzymes et le poids des gonades continuent à augmenter, atteignant un pic durant la période de fraie en avril-mai. Les changements saisonniers dans d'autres parties du cerveau comme le cervelet, les lobes optiques et la médulla (M/HB) sont moins drastiques que dans FB, approximativement 50 fois moins, mais tout en ayant le même style de profil : pic en février et diminution par la suite. L'asynchronisme entre l'ARNm et l'activité enzymatique pourraient être dû aux multiples facteurs et mécanismes opérant indépendamment au niveau transcriptionnel, translationnel et/ou post-translationnel.

Des études antérieures ont montré que l'augmentation saisonnière de l'aromatase au niveau du cerveau du poisson rouge est médiée par des œstrogènes synthétisés *in situ* à partir d'androgènes plasmatiques ou directement à partir de la circulation.

Les changements saisonniers de l'aromatisation de stéroïdes au niveau du cerveau du poisson rouge joue un rôle essentiel dans la reproduction mais des études ultérieures doivent encore en préciser le rôle exact.

2.4 Effets des agents endogènes et exogènes sur l'expression de l'aromatase

2.4.1 Chez l'homme

Chez l'homme, l'expression de l'aromatase et sa régulation dans les différents types de tissus sont assez bien documentées (Simpson *et al.*, 2002). En effet, cette enzyme fait l'objet de préoccupations particulières. Approximativement 60% des cancers du sein sont des cancers hormone-dépendants dont les cellules contiennent des récepteurs à œstrogènes, lesquels sont nécessaires à la prolifération des cellules cancéreuses. Le rôle biochimique possible des œstrogènes dans la croissance de ce type de cancer n'est pas encore tout à fait compris. On sait aujourd'hui que les œstrogènes initient la croissance des cellules cancéreuses réceptives aux œstrogènes et induisent également des facteurs de croissance. D'autre part, dans ce tissu cancéreux, on observe une augmentation de l'expression du cytochrome P450 aromatase. L'objectif des nombreuses études est de trouver des substances inhibitrices de l'aromatase pour bloquer la croissance du cancer œstrogène-dépendant avec le moins d'effets secondaires possibles. Un autre type d'étude que l'on peut également rencontrer dans la littérature est l'impact des pesticides à faible concentration sur le système reproducteur humain. Par exemple, les fongicides comme le prochloraz et l'imazalil se sont révélés être des inhibiteurs du *CYP19* aromatase sur les microsomes de placenta humain (Vinggaard *et al.*, 2000). Les microsomes de placenta humain sont recommandés par EDSTAC (*Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee*) pour étudier le potentiel d'un perturbateur endocrinien à inhiber l'aromatase chez l'homme. D'autre part, la corrélation entre la baisse de la fertilité chez l'homme et l'impact des polluants sur celle-ci reste assez controversée. En effet, si certains inhibiteurs de l'aromatase montrent clairement des effets néfastes sur la reproduction des rats et des souris, ça ne paraît pas aussi évident de le montrer chez l'homme (Vinggaard *et al.*, 2000). De plus, le rôle exact des œstrogènes et de l'aromatase dans la fertilité des mâles n'est pas encore clairement compris.

Tableau 2 : Tableau présentant certaines substances inhibitrices ou inductrices de l'aromatase à des fins thérapeutiques :

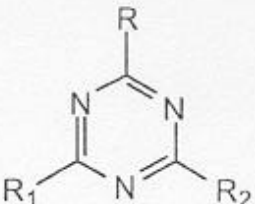
Substance	Effet	Référence
Prostaglandine E ₂ (PGE ₂)	PGE ₂ augmente l'AMPC intracellulaire et stimule la synthèse des oestrogènes	Brueggemeier <i>et al.</i> , 2001
Flavonoïdes, produits naturels des plantes	Les produits flavonoïdes naturels ont démontré une activité anticarcinogène en inhibant l'activité de l'aromatase	Brueggemeier <i>et al.</i> , 2001
Tamoxifen (ICI 46 474),	Substances pharmacologiques antiœstrogéniques non stéroïdiennes	Séralini <i>et al.</i> , 2001
La molécule 4-OHA, androst-4-ene-3,6,17-tri-one	Ces composés sont des inhibiteurs stéroïdiens et se lient irréversiblement au site actif de l'enzyme	Séralini <i>et al.</i> , 2001 ; Shilling <i>et al.</i> , 1999
Imidazole, triazole, fadrozole, vorozole, letrozole, anastrozole	Agents antifongiques non stéroïdiens inhibant l'enzyme P-450	Séralini <i>et al.</i> , 2001

2.4.2 Chez les autres vertébrés

La majeure partie des études réalisées sur les autres vertébrés comme le rat, la souris et les téléostéens concernent en réalité des espèces modèles permettant de tester l'efficacité de toute une série de substances inhibitrices de l'aromatase qui pourraient être utilisées comme traitement contre le cancer du sein. En effet, très peu d'études montrent les effets *in vitro* et *in vivo* des composés exogènes sur l'activité de l'aromatase des populations naturelles.

Tableau 3 : Tableau retenant les études qui ont eu pour objectif de montrer l'impact des xénobiotiques sur différentes espèces de vertébrés.

Substance	Espèce	Effet	Référence
Fenarimol (fongicide)	rat	Inhibition du comportement d'accouplement chez le mâle dû à l'inhibition de la conversion des androgènes en œstrogènes au niveau du cerveau. Il inhibe aussi la parturition chez les femelles car les E ₂ à terme induisent le travail.	Hirsch <i>et al.</i> , 1987
Flavonoïdes (phytoœstrogènes)	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>In vitro</i> , inhibition de l'activité de l'aromatase au niveau de l'ovaire	Pelissero <i>et al.</i> , 1996
17-a-éthinyloestradiol (EE ₂)	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	EE ₂ induit l'expression du gène de l'aromatase au niveau du testis. Tous les mâles exposés à 10 ng/l de EE ₂ présentent de l'ARNm de l'aromatase.	Scholz et Gutzeit, 2000
Les hydrocarbures polycycliques aromatiques (Pahs)	Flounder (<i>Platichthys flesus</i> L.)	Le kétoconazole (KCZ) et l'aminogluthéthimide (AMG) sont des inhibiteurs du P450arom résultant en une diminution de la synthèse d'E ₂ de 50% par rapport aux contrôles.	Monteiro <i>et al.</i> , 2000
Fenarimol	reptiles	Inhibition de la détermination du sexe des gonades chez la femelle.	Williams <i>et al.</i> , 2000
Fadrozole	Saumon coho	Durant la maturation sexuelle, on observe une inhibition de E ₂ par le cerveau.	Afonso <i>et al.</i> , 1997



Compound	R	R ₁	R ₂
atrazine	Cl	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH ₂ CH ₃
deethylatrazine	Cl	NHCH(CH ₃) ₂	NH ₂
deisopropylatrazine	Cl	NH ₂	NHCH ₂ CH ₃
didealkylatrazine	Cl	NH ₂	NH ₂
hydroxyatrazine	OH	NHCH(CH ₃) ₂	NHCH ₂ CH ₃
deethylhydroxyatrazine	OH	NHCH(CH ₃) ₂	NH ₂
deisopropylhydroxyatrazine	OH	NH ₂	NHCH ₂ CH ₃

Figure 19 : Structure chimique de l'atrazine et de ses métabolites (Graymore *et al.*, 2001).

DDT	rat	Le DDT diminue l'activité de l'aromatase au niveau de l'ovaire et au niveau de l'utérus.	Iasinskaia et Rozanov, 2001
Effluents publics	Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	Les femelles adultes montrent une baisse de l'activité de l'aromatase et une augmentation chez les juvéniles.	Noaksson <i>et al.</i> , 2003

Les études réalisées ci-dessus montrent soit une inhibition, soit une activation de l'aromatase qui sont corrélées avec les niveaux d'œstradiol plasmatique. Si il y a activation de l'enzyme, alors il y a augmentation des niveaux d'œstradiol dans le sang et *vice-versa*. Certaines études montrent aussi des troubles dans les comportements de reproduction chez les espèces touchées. De manière générale ces études se limitent à des conditions expérimentales, rares sont celles qui reportent les effets à un niveau populationnel.

3. L'atrazine

3.1 L'atrazine et son utilisation

L'atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropyl-amino-*s*-triazine) est un herbicide sélectif de la famille des triazines commercialisé à travers le monde sous différents noms : Atrataf®, Crisazina®, Flotrazine®, Gesaprim®, ... L'atrazine a été utilisé pour la première fois à la fin des années 50 et a connu un succès croissant auprès des agriculteurs, de sorte qu'aujourd'hui il s'agit d'un des herbicides les plus pulvérisés sur le globe, à raison de 70 à 90 mille tonnes par an (Graymore *et al.*, 2001). L'atrazine est utilisé comme herbicide sélectif pré- et post-émergeant pour contrôler la croissance annuelle des plantes adventices dans les cultures d'asperges, de bananes, de céréales, de maïs, de citrons, de cannes à sucre, de vignes, etc, ... (Graymore *et al.*, 2001). L'atrazine est aussi utilisé pour assainir un terrain avant la construction de sites industriels ou parking (IARC, 1999). Il peut aussi servir d'algicide dans les bassins ornementaux.

3.1.1 Mode d'action de l'atrazine en tant qu'herbicide

L'atrazine agit via la photosynthèse. En fait, cet herbicide inhibe le transport photosynthétique des électrons au niveau du photosystème II. De plus, l'inhibition de la photosynthèse affecte des processus qui sont indirectement dépendants de la photosynthèse comme l'ouverture des stomates, la transpiration, le transport ionique, et d'autres réactions qui sont dépendantes de la réserve d'énergie. Malgré sa toxicité pour les plantes, certaines d'entre-elles (maïs, céréales,...) possèdent des mécanismes de détoxification efficaces contre cet herbicide, ce qui fait de lui un herbicide sélectif. La structure de l'atrazine est présentée à la figure 19.

3.1.2 Régime d'utilisation et sa limitation

Aux Etats-Unis, l'agence pour la Protection de l'Environnement (EPA) a estimé que 31 à 35 mille tonnes d'atrazine (forme active) ont été utilisées annuellement dans l'agriculture céréalière en 1987, 1993 et 1995 (IARC, 1999) à raison d'un taux d'application de 3,4 kg/ha. En Europe, l'usage des herbicides en général et de l'atrazine en particulier reste fort intensif. Depuis 1980 (*Drinking water directive* 80/778/CEE), le législateur européen a fixé la concentration maximale de pesticides dans les eaux destinées à la consommation humaine à

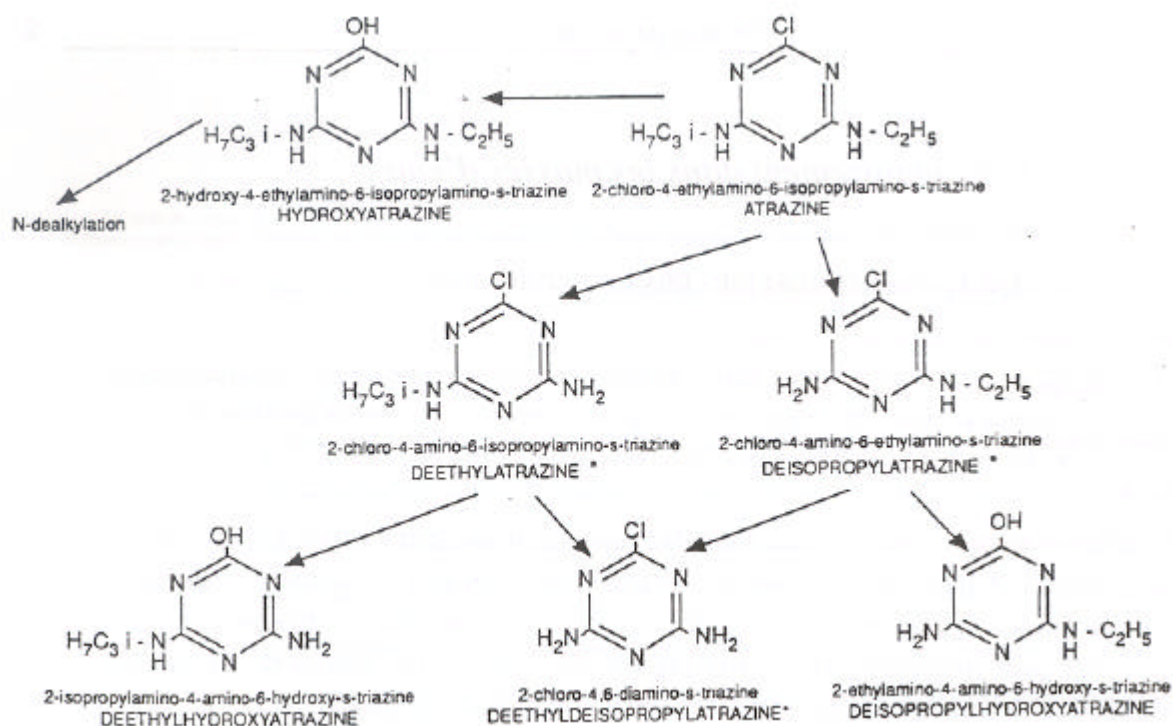


Figure 20 : Voie de dégradation de l'atrazine (Donati et Funari, 1993).

0,1 µg/l par substance individualisée, avec un total maximal de 0,5 µg/l pour l'ensemble des substances (Ministère de la Région Wallonne, 2000).

L'usage des pesticides en Belgique figure parmi les plus intensifs de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique). En 1995, 140 tonnes d'atrazine ont été déversées dans notre pays. De plus, l'atrazine est la seule substance qui contamine les nappes phréatiques de manière générale et non ponctuelle en région wallonne : au moins 60% des contaminations, tous pesticides confondus, sont dues à l'atrazine (Ministère de la région Wallonne, 2000). La carte 1 et la figure 21 montrent les teneurs maximales observées en atrazine pour les principales nappes aquifères et localisent les captages où la concentration en atrazine a dépassé au moins une fois la concentration maximale admissible (0,1 µg/l).

3.2 Comportement dans les masses d'eau

3.2.1 Caractéristiques physico-chimiques

La famille des herbicides chloro-*s*-triazine se caractérise par un anneau hétérocyclique sur lequel on trouve trois atomes d'azote en position symétrique, un atome de chlore et deux substituants N-alkyl (Donati et Funari, 1993).

L'atrazine se caractérise par une solubilité modérée dans l'eau (33 µg/l à 20°C), mais celle-ci augmente dans les solvants organiques. L'anneau *s*-triazine est particulièrement résistant à la dégradation, ce qui confère à la molécule une grande stabilité et lui permet de résister dans des milieux différents. D'autre part, les valeurs de DT50 (DT50 = temps qu'il faut pour diminuer de moitié la concentration initiale d'une substance dans un environnement donné par les processus de dégradation) au niveau du sol sont extrêmement variables et se situent entre 20 et 385 jours. La valeur de DT50 dans le système aquatique varie de 3 à 300 jours (Huber, 1993).

3.2.2 Entrée dans les masses d'eau

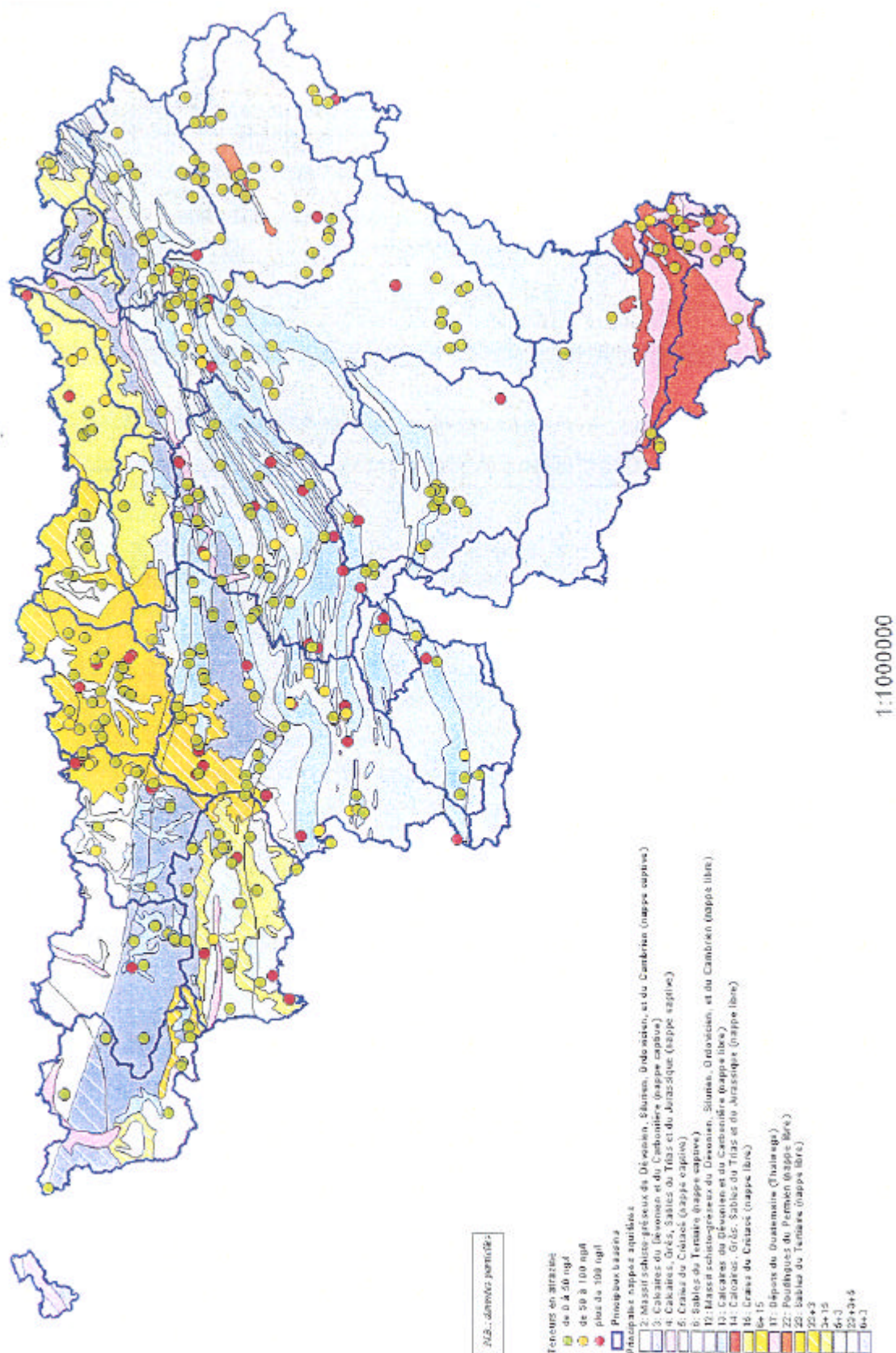
L'atrazine est introduite dans l'environnement par pulvérisation sur le sol. La contamination des eaux de surface est le résultat du ruissellement de l'eau de pluie ou encore de l'eau d'irrigation entraînant l'atrazine dans les nappes phréatiques. L'arrivée de l'herbicide dans le milieu aquatique peut aussi être dû aux retombées atmosphériques ou encore à des déversements irresponsables.

3.2.3 Dégradation de l'atrazine

Dans l'environnement, l'atrazine peut être métabolisée selon trois processus (fig. 20) (Huber, 1993) :

- par hydrolyse : un groupement hydroxyl se substitue à l'atome de chlore, ce qui provoque la formation d'hydroxyatrazine ;
- par N-dealkylation au niveau soit du carbone 4, soit du carbone 6. Ce processus permet la formation du deethylatrazine et du deisopropylatrazine, respectivement ;
- par un mécanisme de clivage de l'anneau triazine, processus utilisé par les micro-organismes.

La photodégradation, l'oxydation, ainsi que d'autres procédés peuvent également intervenir.



Carte 1 : Sensibilité des eaux potables potabilisées vis-à-vis de l'atrazine, teneurs maximales observées entre 1993 et 1999 (Ministère de la Région Wallonne, 2000).

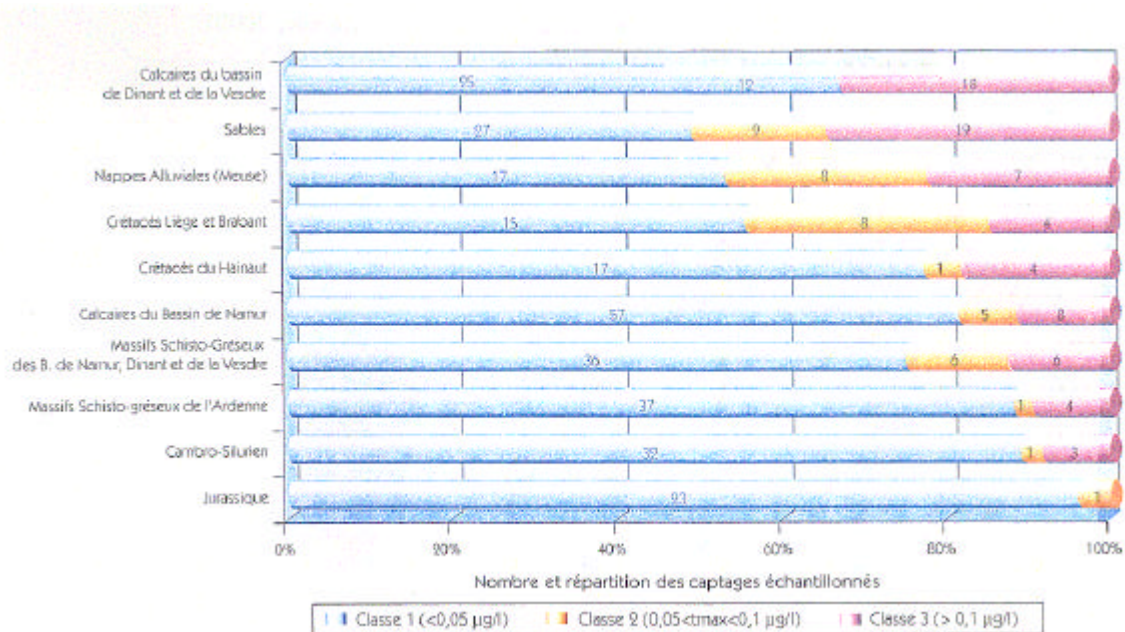


Figure 21 : Concentration de pesticides dans les eaux souterraines en Région wallonne : teneur maximale observée par captage pour l'atrazine dans la période 1993-1998 (Ministère de la Région Wallonne, 2000).

3.3 Caractère toxique de l'atrazine

3.3.1 Accumulation et élimination de l'atrazine dans les organismes aquatiques

L'accumulation de l'atrazine au sein d'un organisme peut avoir lieu selon deux mécanismes : par l'eau et par la nourriture. L'effet toxique du polluant sera d'autant plus important que celui-ci possède la capacité de s'accumuler dans les tissus de l'organisme. Ce phénomène, appelé bioconcentration, concentre le toxique à l'intérieur de l'organisme et soumet ce dernier à une concentration nettement plus élevée que celle trouvée dans l'environnement. Il est possible de calculer un facteur de bioconcentration (BCF) qui définit le rapport entre la quantité de toxique présente dans l'organisme et celle présente dans le milieu. Gluth *et al.*, 1984 ont démontré que pour la carpe commune (*Cyprinus carpio*), le BCF de l'atrazine était de 1 pour le sang, les branchies et les muscles et se situe entre 2 et 4 pour le foie, les intestins et les reins. De plus, l'atrazine est reconnu comme étant un composé modérément lipophile (capacité à s'accumuler dans le tissu graisseux), sa bioconcentration dans les différents tissus reste donc faible. Ceci traduit aussi l'intervention des processus de détoxification. Dans le cas spécifique de l'atrazine, c'est la glutathion-S-transférase qui catalyse le couplage entre le toxique et le glutathion. De cette réaction découle un complexe hydrophile plus facilement excrété par l'organisme.

3.3.2 Toxicité de l'atrazine

Certaines études ont montré que l'atrazine perturbait un nombre considérable d'espèces comme les macrophytes, le phytoplancton, les invertébrés (mollusques et crustacés) et les vertébrés (poissons) (Huber, 1993).

En ce qui concerne plus particulièrement les poissons, on a constaté que l'atrazine avait un effet sur la carpe (*Cyprinus carpio*). Une concentration entre 100 et 1000 µg/l pendant une période relativement courte (6-72h), on constate des niveaux de glucose et de cortisone élevés, ce qui traduit une réponse au stress. Les valeurs de LC50 (LC50 = dose létale qui engendre un mortalité de 50% au sein de la population après un temps d'exposition t défini) basées sur une exposition de 96 heures varient d'une espèce à l'autre et se situent entre 550 µg/l et > 100 mg/l dans certains cas (*Crucian carp*).

D'autres auteurs parlent plutôt de valeurs NOEC (NOEC = *non observable effect concentration*). Après une exposition de 96 heures, on n'observe aucun effet chez le poisson rouge (*Carassius auratus*) à une concentration de 1000 µg/l. La valeur NOEC décline si l'exposition se prolonge. Par exemple, elle n'est plus que de 700 µg/l lorsque le temps d'exposition passe à 14 jours. Une étude réalisée par Kettle *et al.*, a montré que *Ictalurus punctata*, *Dorosoma cepedianum* et *Lepomis macrochirus* présentaient des changements de comportement de cour ainsi que dans la capture de nourriture à une concentration aussi basse que 20 µg/l. De plus, la quantité de nourriture qu'ils ingéraient était inférieure à celle ingérée par la population de la rivière contrôle.

3.3.3 Effets de l'atrazine sur l'aromatase

Les connaissances actuelles de l'effet de l'atrazine sur le gène de l'aromatase sont assez limitées et portent sur des espèces d'ordres différents.

Les études de Crain *et al.* (1999) ont montré que les populations d'alligators américains de Floride montraient une altération du taux circulant d'hormones, des anomalies dans la

morphologie des gonades comparé à des populations provenant d'un site de référence. L'atrazine seul ne produit pas ces effets. Ils ont pu montrer qu'à une concentration de 14 mg/l d'atrazine, l'activité de l'aromatase était élevée dans les gonades. De plus, une exposition d'embryons d'alligator au 2,4-D ou à l'atrazine ne cause aucune altération significative de la structure des gonades et de l'activité des enzymes de la stéroïdogénèse hépatique.

Sanderson *et al.* (2000) ont utilisé une lignée de cellules cancéreuse H295R pour examiner la capacité des 2-chloro-*s*-triazines (i.e., atrazine, simazine et promazine) à interférer avec l'activité et/ou l'expression de l'aromatase. A une concentration de 30 µM après une exposition de 24h, ces herbicides induisent l'activité de l'aromatase de 2 à 2,5 de fois. L'atrazine, le simazine ou le propazine après une exposition de 24h augmentent l'ARNm de l'aromatase entre 1,5 et 2 fois comparés aux contrôles. L'augmentation de l'activité de l'aromatase serait due à une augmentation de l'expression du *CYP19*.

Les études de Hayes *et al.* (2002) montrent que les mâles du xénope (*Xenopus laevis*) ont une concentration plasmatique en testostérone 10 fois plus faible que les individus contrôles lorsque ces derniers sont exposés à 25 µg/l d'atrazine. Aussi, à toutes les doses testées (0,1 ; 1 ; 10 et 25 µg/l) l'atrazine produit des anomalies au niveau des gonades : gonades multiples ou hermaphrodisme. Pour expliquer ces phénomènes, ils ont émis l'hypothèse suivante : la diminution des androgènes serait due à une induction de l'aromatase puisque ces derniers sont le substrat de l'enzyme. L'augmentation de l'activité de l'aromatase, elle, augmente la production de l'œstradiol induisant des altérations du tissu gonadal. Un effet tératogène, une inhibition de la croissance et une mortalité des amphibiens en réponse à l'atrazine n'ont pas été démontrées à des doses environnementales. Des doses élevées sont nécessaires pour voir l'apparition de ces effets.

II

Objectifs du mémoire

II. Objectifs

Les composés anthropogéniques introduits dans l'environnement aquatique sont connus pour causer des perturbations du système reproducteur chez les vertébrés et les invertébrés en interférant avec le système endocrinien. La perturbation de la fonction hormonale chez les poissons peut perturber un nombre considérable d'événements, incluant la maturation sexuelle, la production de gamètes et leur transport, le comportement sexuel, la fertilité, la gestation, ou des modifications de fonctions qui sont dépendantes de l'intégrité du système reproducteur. Ces perturbations peuvent alors se répercuter sur le succès de reproduction de l'espèce touchée et ainsi affecter l'ensemble de la population. L'atrazine est un herbicide sélectif largement utilisé en Belgique, contaminant un certain nombre de nos nappes phréatiques. Depuis une quinzaine d'années, le monde scientifique ne doute plus des effets néfastes de cet herbicide sur les populations sauvages.

Des études récentes soupçonnent l'atrazine d'être un perturbateur endocrinien mais peu d'études se sont penchées sur le sujet. De plus, elles concernent les amphibiens, les oiseaux, les mammifères ou des cellules isolées humaines. Certaines de ces études montrent que l'atrazine aurait un effet sur l'activité de l'aromatase. Cette enzyme est essentielle pour la reproduction puisqu'elle convertit les androgènes en œstrogènes indispensables pour le bon fonctionnement de la reproduction comme la recrudescence des ovaires, les caractères sexuels secondaires, etc.... De plus, l'étude réalisée sur la dynamique des stéroïdes sexuels par Spano' *et al.* (2003), montre qu'il y a un effet sur le ratio E₂/T chez des poissons rouges (*Carassius auratus*) adultes intoxiqués à une concentration de 1000 µg/l d'atrazine pendant 21 jours. Ceci soutiendrait l'idée que l'enzyme intervenant dans leur conversion est touchée.

Le principal objectif de ce travail est de pallier au manque de données scientifiques concernant les effets de l'atrazine en tant que perturbateur endocrinien sur la reproduction des poissons.

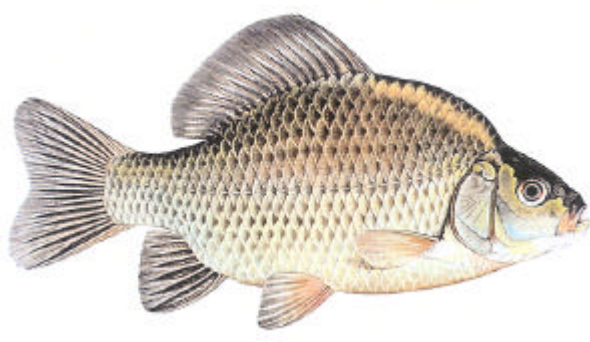
Nous allons aborder notre étude en nous focalisant sur l'expression de cette enzyme importante qu'est l'aromatase au niveau des gonades de poissons rouges. En plus, de réels soupçons pesant sur l'interaction de cet herbicide sur cette enzyme, cette approche nous permettra de mettre au point des techniques de dosage de l'expression d'un gène (*CYP19a*) par PCR en temps réel. En effet, ces techniques sont largement utilisées en biologie moléculaire mais manquent encore cruellement d'applications pour résoudre des problèmes environnementaux. Pourtant, les enjeux sont grands et de plus en plus, l'écologie sera amenée à utiliser ces techniques afin mieux de comprendre l'origine des problèmes constaté à l'échelle populationnelle.

Ainsi, dans un premier temps, nous allons nous attarder sur la mise au point de la PCR en temps réel. Ensuite, nous pourrons suivre un éventuel effet de l'atrazine sur l'expression du gène de l'aromatase. Enfin et en parallèle, nous réaliserons des dosages d'hormones (la 11-kétotestostérone et l'œstradiol) par RIA afin de connaître l'état du système reproducteur de nos poissons et de tenter de le corrélér avec l'expression de l'aromatase.

III

Matériel et méthodes

A)



B)



Figure 1 : En a), gravure et en b), photo représentant le poisson rouge (*Carassius auratus auratus*) (www.fishdatabase.org).



Figure 2 : Système ESCADA installé au sein de l'Unité de Recherche en Biologie des Organismes.

III Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1 Espèce ciblée

Le poisson rouge *Carassius auratus auratus*, Linnaeus (1758) fait partie de la famille des cyprinidés et de l'ordre des cypriniformes (fig. 1). Il vit dans les rivières et les lacs aux eaux stagnantes. Il supporte des eaux pauvres en oxygène et des gammes de pH allant de 6.0 à 8.0 unités. D'un point de vue géographique, le poisson rouge provient essentiellement des régions tropicales d'Asie et a été introduit partout dans le monde. Il atteint son âge de première maturité sexuelle à 1 an, mais celle-ci peut être retardée si les conditions environnementales sont défavorables. C'est un pondreur multiple à ovogénèse groupe synchrone. En effet, les femelles pondent entre 3 et 10 lots d'œufs sur une période d'une dizaine de jours. Les œufs sont déposés sur un substrat végétal et la fécondation est externe.

Les poissons rouges juvéniles utilisés dans le cadre de cette expérience proviennent d'un stock d'alevins maintenus dans les infrastructures d'élevage de l'URBO depuis environ 6 mois avant le démarrage de l'expérience. Ils ont été nourris à l'aide d'aliment commercial. Aussi, ces alevins se sont très bien adaptés aux conditions de stabulation en captivités.

1.2 Dispositif expérimental de contamination

L'ensemble de l'expérience s'est déroulé au sein de l'Unité de Recherche en Biologie des Organismes (URBO) et consistait à contaminer de façon chronique (doses sublétales) des juvéniles mâles et femelles. Le toxique choisi pour la contamination chronique a été l'atrazine Pestanal® (Riedel-de-haën).

1.2.1 Schéma expérimental

Le schéma expérimental s'est présenté de la façon suivante :

162 poissons, mâles et femelles confondus, ont été répartis en trois groupes. Ces trois groupes d'individus ont été soumis à trois traitements expérimentaux différents :

- Un groupe contrôle de 54 individus non intoxiqués
- Un groupe de 54 individus intoxiqués à une concentration d'atrazine de 100 µg/l
- Un groupe de 54 individus intoxiqués à une concentration d'atrazine de 1000 µg/l

L'ensemble de l'expérience s'est déroulé sur une période de 56 jours. Durant toute cette période, les poissons ont été soumis à une photopériode de 16 heures de jour suivies de 8 heures de nuit. Ils ont été nourris à raison d'une dose journalière calculée par rapport à la biomasse de poissons présente dans chaque bac. Les aliments utilisés sont des granulés commerciaux pour poissons (Trouvit). Pour éviter un accroissement du stress lié aux conditions expérimentales, les poissons ont été acclimatés aux bassins expérimentaux pendant les deux semaines qui ont précédé le début de la contamination.

Le système de bassins dans lequel sont placés les poissons rouges se compose de trois ESCADA (fig. 2). Chaque ESCADA comporte une série de 6 bacs en polyester d'une

capacité de 120 litres chacun. L'eau y circule en circuit fermé afin de conserver l'atrazine et s'épurer de son contenu toxique en ammoniac et nitrite au sein d'un lit bactérien et ce via une conversion métabolique en nitrate appelée nitrification. Le lit bactérien se développe sur des billes d'argex et est recouvert d'une mousse filtrante. L'eau ainsi filtrée est pompée et renvoyée dans les différents bacs. L'oxygénation est, quant à elle, assurée par un système de pompe à air. La température est maintenue constante à l'aide d'un système de résistance chauffante contrôlée par un thermostat.

Différents paramètres physico-chimiques ont été contrôlés au cours du temps, à savoir les concentrations en azote ammoniacal, nitrites, et nitrates. Ces différentes mesures ont été effectuées une à deux fois par semaine sur base d'analyses spectrophotométriques (spectrophotomètre portable HACH 2010). La température, la concentration en oxygène dissous ainsi que le pH ont été mesurés quotidiennement à l'aide d'un oxymètre (WTW OX196) et d'un pH-mètre (WTW pH330). La moyenne de ces paramètres est de 19,1°C ; 8,4 mg/l d'O₂ et 8,2 pour le pH.

1.2.2 Contamination des bassins par l'atrazine

Comme déjà cité plus haut, deux concentrations d'atrazine ont été appliquées 100 et 1000 µg/l. Les deux doses proviennent de la publication acceptée de Spano' *et al.*, par ailleurs la dose de 1000 µg/l est reconnue comme étant une dose NOEC (no-observed-effect-concentration).

Vu la faible solubilité de l'atrazine dans l'eau (70 mg/l), une dissolution préalable dans de l'acétone s'est avérée nécessaire pour optimiser la contamination (annexe 1). De l'acétone seul a été ajouté dans les bassins témoins.

Pour s'assurer que les poissons étaient bien soumis à une concentration constante en atrazine pendant toute la période de l'expérience, une vérification hebdomadaire a été réalisée pour chacun des bassins. Tout d'abord, on a procédé à une extraction de l'atrazine dissoute sur cartouche (Waters Oasis HLB), ensuite la mesure de la concentration a été effectuée par HPLC (pompe Waters 600, détecteur PDA Waters 996, autosampler Waters 717, colonne Waters Symmetryshield RP18 5 µM) (annexe 2). Dans le cas d'une diminution de la concentration et, sur base de celle-ci, de l'atrazine était réintroduite dans les bassins concernés.

1.2.3 Prélèvements des poissons soumis à l'expérience

Plusieurs séries de prélèvements ont été effectués et échelonnés selon le calendrier suivant :

- T_{0j} : prélèvement des 54 poissons soumis à aucune contamination
- T_{30j} : prélèvement de 54 poissons répartis dans les trois séries de bassins, après 30 jours de contamination
- T_{56j} : prélèvement de 54 poissons répartis dans les trois séries de bassins, après 56 jours de contamination

Juste après le prélèvement des poissons dans les bassins, ils ont été pesés à l'aide d'une balance (Mettler AE200) d'une précision de 0,001 g et mesurés au millimètre près grâce à une règle à butée. Sur ces mêmes poissons, un prélèvement sanguin a aussi été réalisé au moyen de seringues héparinées. Le sang fut placé dans des tubes à hémolyse et centrifugé à 4500 rpm

pendant 20 minutes. Le plasma et le sérum récoltés furent aliquotés et stockés à -80°C permettant ainsi la réalisation de différents dosages. Une fois le sang récolté, nous avons procédé à la décapitation des poissons. Différents organes ont été prélevés et pesés : le foie, le cerveau, l'hypophyse et les gonades. Les différents types d'organes ont alors été placés dans des cryotubes et directement congelés dans de l'azote liquide et ont ensuite été stockés à -80°C . Cette dernière étape nous a permis de déterminer le sexe de chaque individu prélevé, étant donné qu'il n'existe pas de dimorphisme sexuel chez le poisson rouge. Ces différentes données nous ont notamment permis de calculer l'indice gonadosomatique ($\text{GSI} = \text{poids des gonades} / \text{poids corporel}$) de chaque individu.

2. Méthodes

2.1 Extraction de l'ARN total

2.1.1 Extraction de l'ARN total au TriPure® (Roche)

Le TriPure® est une solution monophasique de phénol et de thiocyanate de guanidine qui permet de lyser les cellules en protégeant l'ARN des RNase endogènes. L'addition de chloroforme, suivie d'une centrifugation, sépare la solution en une phase organique et une phase aqueuse contenant l'ARN. Après élimination de la phase organique, l'ARN est récupéré par précipitation avec de l'isopropanol. Méthode de Chomczynski et Sacchi, 1987.

Matériels :

- TriPure® reagent (Total RNA Isolation Reagent, Roche)
- Chloroforme, (Sigma, St Louis, USA)
- Isopropanol, (Sigma, St Louis, USA)
- Ethanol 75%
- Eau distillée
- Tips à filtre et microtubes RNase free

Méthode :

1. Peser les gonades conservées à -80°C (150 mg de tissus sont nécessaires par extraction)
2. Ajouter 1 ml de TriPure® pour 150 mg de tissu
3. Broyer le morceau de tissu dans le microtube à l'aide d'une tige RNase free
4. Homogénéiser, puis incubé 5 minutes à température ambiante
5. Centrifuger à $12,000 \times g$ (ALC microcentrifuge 4214) pendant 15 min à 4°C
6. Reprendre le surnageant et le placer dans un autre microtube (le culot contient des débris cellulaires)
7. Ajouter 0,2 ml de chloroforme par ml de TriPure®
8. Homogénéiser par inversion pendant 15 sec et laisser reposer 5 min à t° ambiante
9. Centrifuger à $12,000 \times g$ (ALC microcentrifuge 4214) pendant 15 min à 4°C
10. Prélever la phase supérieure qui contient l'ARN
11. Ajouter 0,5 ml d'isopropanol par ml de TriPure au surnageant
12. Homogénéiser par inversion pendant 15 sec et laisser reposer 30 min à -20°C
13. Centrifuger à $12,000 \times g$ (ALC microcentrifuge 4214) pendant 15 min à 4°C

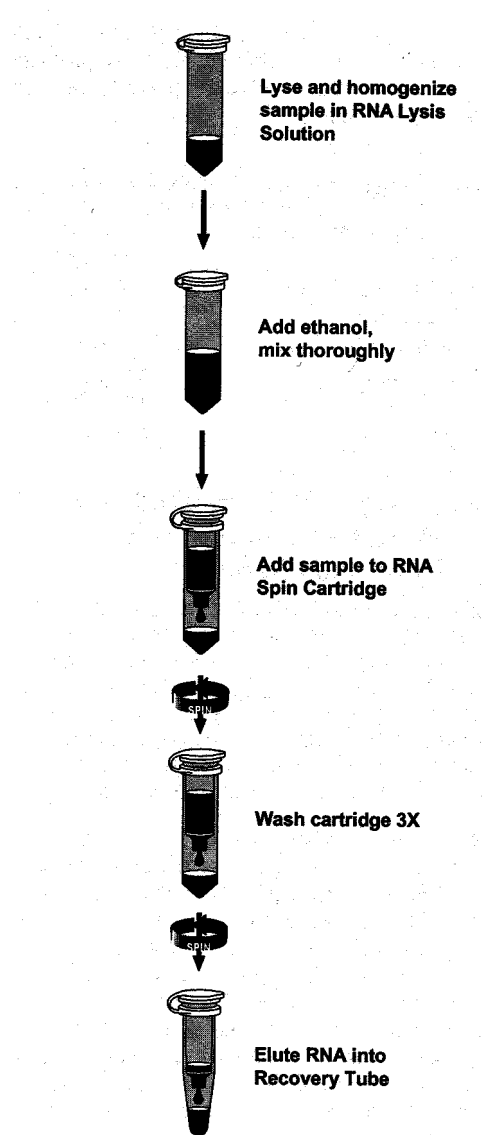


Figure 3 : Schéma illustrant l'extraction de l'ARN total suivant le kit *Micro-to-Midi Total RNA Purification System*, Invitrogen, Carlsbad, USA.

14. Laver le culot d'ARN avec 1 ml d'éthanol 75%
15. Centrifuger à 7500 x g (ALC microcentrifugeuse 4214) pendant 5 min à 4°C
16. Eliminer le surnageant et sécher le culot à l'air libre pendant 2 min
17. Resuspendre le culot dans 50 µl d'eau distillée
18. Incuber l'ARN à 55°C pendant 10 min puis mettre sur glace.
19. L'ARN est ensuite stocké à -80°C

2.1.2 Extraction de l'ARN total à l'aide du kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System, Invitrogen, Carlsbad, USA

Les cellules sont lysées et homogénéisées en présence de thiocyanate de guanidine, solution permettant de lyser les cellules en protégeant l'ARN des RNAses endogènes. L'éthanol est ajouté à l'homogénat, et l'ensemble sera traité à travers la mini colonne (*RNA spin cartridge*). L'ARN se lie sur la membrane de silice dans la colonne, les autres constituants seront élués grâce à une solution de lavage. Pour terminer l'ARN lui-même sera élué dans de l'eau stérile. Le schéma de l'extraction est illustré à la figure 3.

Composés :

- RNA Lysis Solution
- Wash buffer I
- Wash buffer II
- RNase-free Water
- RNA Spin Cartridges
- RNA Wash Tubes (2 ml)
- RNA Recovery Tubes
- Homogenizer
- β-mercaptoéthanol
- Ethanol 70%
- Tips à filtre et microtubes RNase free

Eléments du kit Micro-to-Midi Total RNA System, Invitrogen, Carlsbad, USA

Méthode:

1. Peser les gonades conservées à -80°C (100 mg de tissus sont nécessaires par extraction)
2. Ajouter 1,2 ml de *RNA Lysis Solution* par 100 mg de tissu ainsi que 10 µl de β-mercaptoéthanol par ml de *RNA Lysis Solution*
3. Homogénéiser l'échantillon à l'aide d'une tige RNase free
4. Transférer l'ensemble sur l'*Homogenizer* et centrifuger à 12,000 x g (ALC microcentrifugeuse 4214) pendant 2 min à 25°C
5. Recommencer le point 4. une deuxième fois
6. Ajouter 0,6 ml d'éthanol 70% pour 100 mg de tissu et vortexer pendant 2 min
7. Appliquer 0,6 ml sur une *RNA Spin Cartridge* et centrifuger à 12,000 x g (ALC microcentrifugeuse 4214) pendant 15 sec à 25°C, jeter ce qui a été élué et recommencer la même opération avec le reste de l'échantillon.

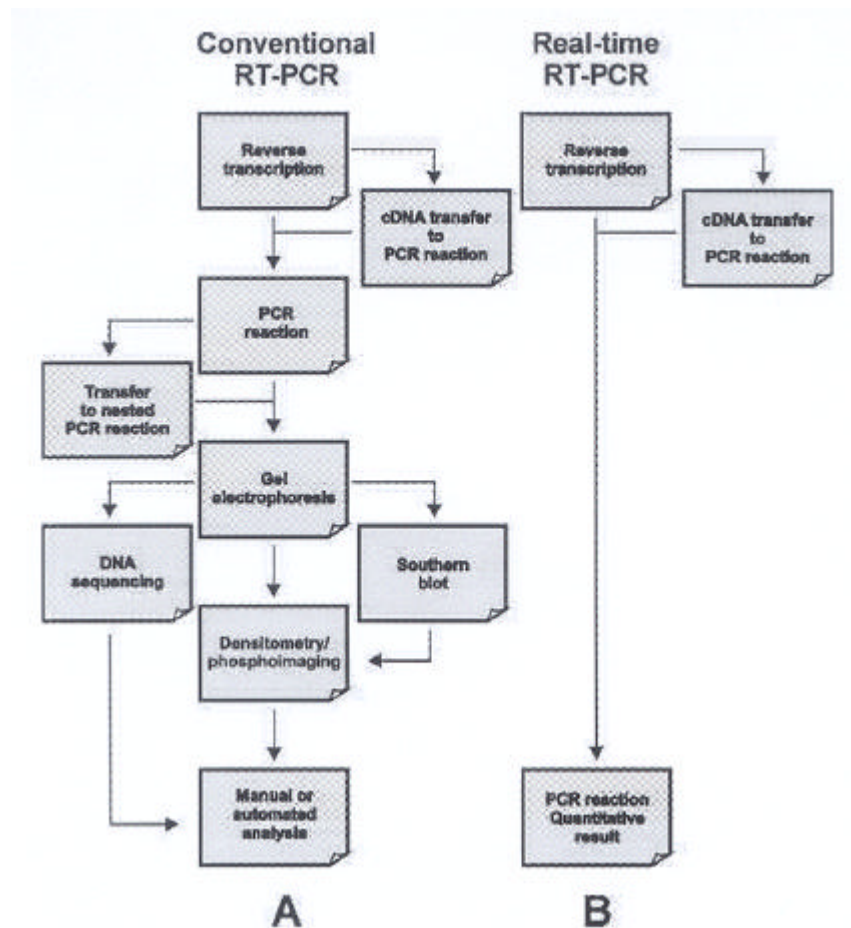


Figure 4 : (A) RT-PCR classique. (B) RT-PCR en temps réel.

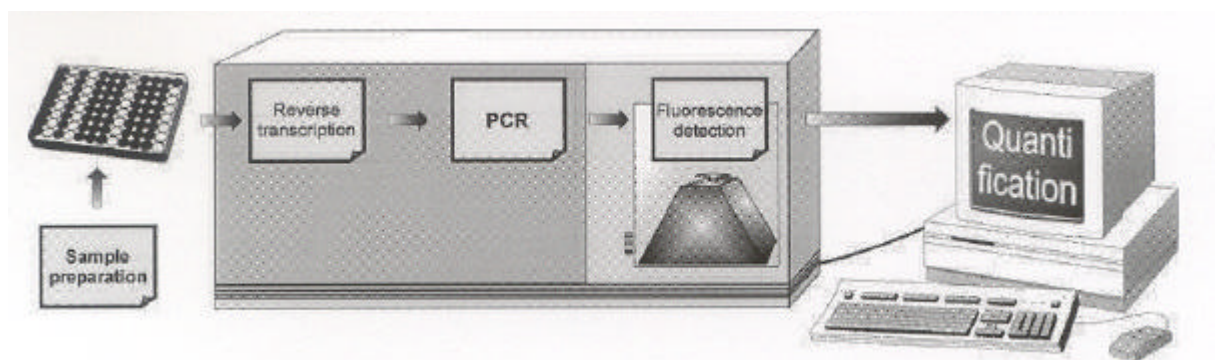


Figure 5 : Appareillage ABI PRIM 7000, Appleid Biosystems, Pays-Bas

8. Ajouter 700 µl de *Wash Buffer I* à la colonne, centrifuger à 12,000 x g (ALC microcentrifugeuse 4214) pendant 15 sec à 25°C, jeter ce qui a été élué et placer la colonne dans un *RNA Wash Tube*
 9. Ajouter 0,5 ml de *Wash buffer II* à la colonne, centrifuger à 12,000 x g (ALC microcentrifugeuse 4214) pendant 15 sec à 25°C, jeter ce qui a été élué, centrifuger à nouveau pendant 1 min à 25°C pour sécher la membrane de la colonne
 10. Enlever la colonne du *RNA Wash Tube* et la placer dans un *RNA Recovery tube*
 11. Ajouter 40 µl de *RNAse-free Water* à la colonne, incubé pendant 1 min à 25°C et centrifuger à 12,000 x g (ALC microcentrifugeuse 4214) pendant 2 min à 25°C, recommencer le processus
- Stocker l'ARN à -80°C

2.2 Dosage des acides nucléiques par spectrophotométrie

Le dosage des acides nucléiques au spectrophotomètre est basé sur le principe que les acides nucléiques absorbent les ultra-violets à une longueur d'onde de 260 nm. Une unité de densité optique (DO) correspond à une concentration connue en ARN ou en ADN. La mesure de 1 DO d'ARN correspond à une concentration de 40 µg/µl, 1 DO d'ADN double brin correspond à une concentration de 50 µg/µl. Il est donc possible de calculer la concentration en acides nucléiques d'une solution grâce à sa DO. Une mesure à 280 nm est également effectuée afin de contrôler une éventuelle contamination par les protéines. Dans notre cas, l'ARN a été resuspendu dans de l'eau distillée.

2.3 Real time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real Time RT-PCR)

La PCR, ou réaction d'amplification en chaîne, permet l'amplification exponentielle et sélective d'une séquence d'ADN cible. Le fragment d'ADN à amplifier est délimité par un couple d'amorces qui lui sont spécifiques, choisies de part et d'autre de la séquence cible. Lors d'une PCR classique, la détection et l'analyse des produits d'amplification est réalisée en fin de réaction, par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium, ce qui permet la séparation des molécules d'ADN double brin en fonction de leur poids moléculaire. Le bromure d'éthidium étant un agent qui s'intercale dans la double hélice d'ADN, les séquences amplifiées, ou amplicons, sont visualisés sous rayonnement ultraviolet qui rend le bromure d'éthidium fluorescent.

Ce qui différencie la real-time PCR de la PCR classique, c'est que la détection de amplicons se fait cycle après cycle, au fur-et-à mesure de la réaction, plutôt qu'en fin de réaction. La quantité d'amplicons présents à chaque cycle est déterminée par l'intensité de la fluorescence d'un agent intercalant qui est ajouté au mix PCR de départ (ici du SYBR-GREEN). Cette molécule s'intercale de façon non-spécifique dans la double hélice d'ADN, et lorsqu'elle est excitée par un laser, elle émet un signal fluorescent qui est proportionnel à la quantité d'ADN double brin présente. Elle permet donc, de suivre en temps réel l'accumulation des amplicons synthétisés au terme de chaque cycle. La comparaison entre la PCR classique et la PCR en temps réel est présentée à la figure 4. La lecture de l'intensité de fluorescence est permise grâce au couplage d'un fluorimètre et d'un thermocycleur (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems, CA, USA) au sien de l'appareil PCR. (fig. 5)

Le signal fluorescent ne peut être détecté qu'à partir d'un certain seuil, ensuite on observe une augmentation exponentielle avant d'arriver à un plateau de saturation. Le cycle correspondant

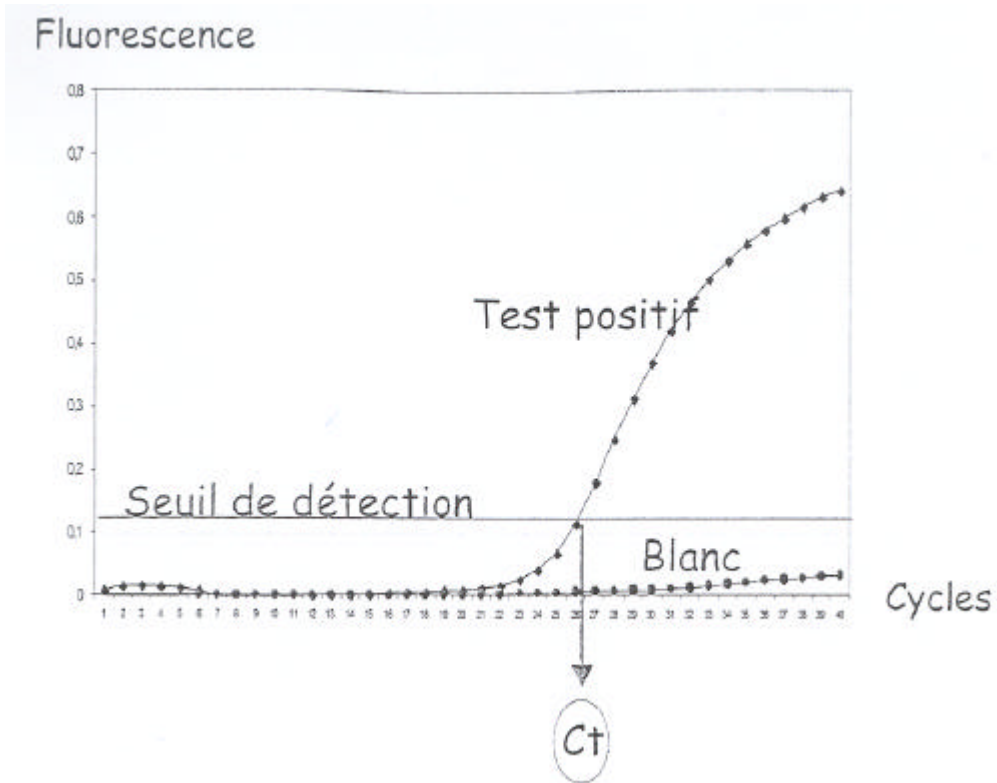


Figure 6 : Représentation de l'amplification exponentielle des produits PCR par rapport au seuil de détection, au cours des cycles PCR d'une PCR en temps réel (Salmon, 2002).

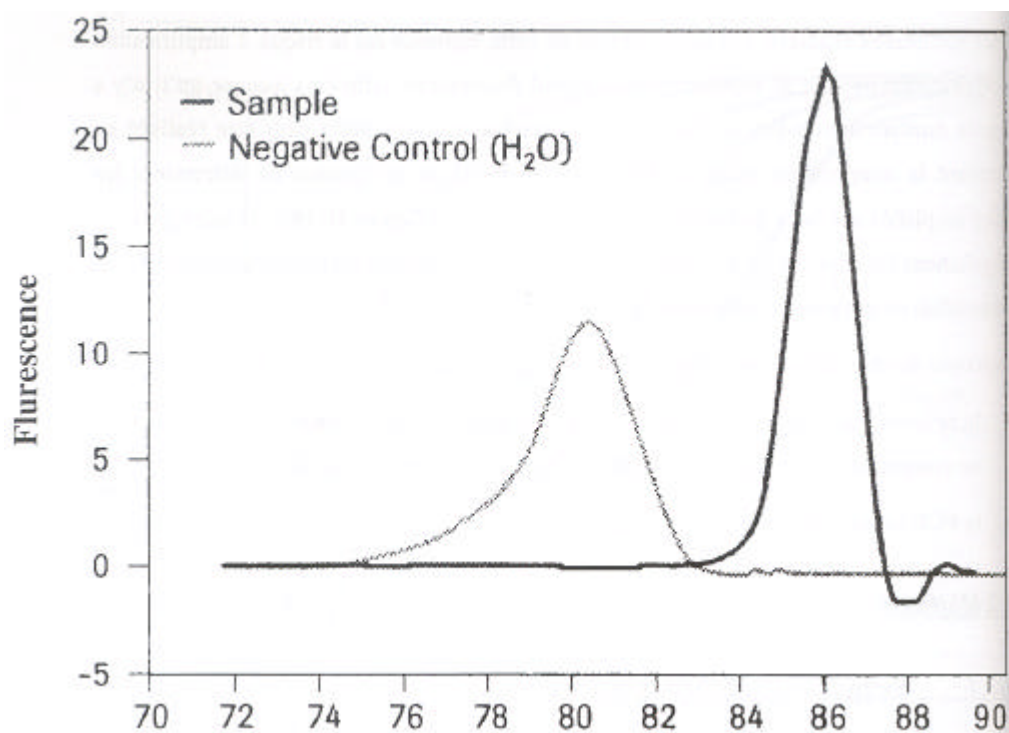


Figure 7 : Schématisation d'une courbe de dissociation des produits réalisée à la suite d'une Real Time PCR (Blaschke *et al.*, 2000).

au milieu de la phase exponentielle est appelé Ct (*threshold cycle*) (fig. 6). ce dernier est inversement proportionnel à la quantité initiale d'ADN cible présent dans l'échantillon.

D'autre part, l'évaluation de la quantité d'ADN se fait contre un standard. C'est à dire qu'on réalise l'amplification d'un fragment de l'ADN d'intérêt ainsi que celle d'un fragment de l'ADN de référence (*housekeeping gene*) dont le niveau d'expression ne varie pas dans les conditions étudiées.

Toutefois, il existe un inconvénient à cette technique de détection non-spécifique. Le risque majeur lié à l'utilisation d'un agent intercalant est la production d'un signal fluorescent accompagnant la formation d'éventuels produits d'amplification non spécifiques ou encore des dimères d'amorces. Cependant, il est possible de contrôler l'identité des produits de la réaction en établissant une courbe de dénaturation thermique des produits de la PCR. On réalise cette opération à l'issue de la PCR en augmentant progressivement la température de 60 à 90°C afin de dissocier séquentiellement les ADN double brin en fonction de leur taille et de leur composition. Ceci permettra de déterminer les produits amplifiés sur base de leur température de melting (fig. 7). Enfin, on peut aussi déposer sur gel d'agarose les produits PCR pour s'assurer que les produits amplifiés sont uniques et correspondent à la taille attendue.

Le protocole de cette technique comprend deux étapes :

- La transcription inverse (RT) qui permet la synthèse d'ADN complémentaire à partir d'ARN.
- La PCR proprement dite.

2.3.1 Transcription Inverse (RT)

Avant de procéder à la transcription inverse, les extraits d'ARN totaux ont tous été traités avec une DNase afin d'éviter toute contamination par de l'ADN génomique.

2.3.1.1 Traitement à la DNase

Matériel :

- DNase (DNase I amplification grade (1 U/ μ l) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)

Méthode :

1) Mélanger l'ARN à la DNase et centrifuger brièvement:

- 1 μ l de DNase
- 2 μ g d'ARN

2) Incuber 20 min à 37°C

3) Stopper la réaction 5 min à 75°C

2.3.1.2 Transcription inverse

Matériels :

- Oligo dT (500ng/ μ l) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
- dH₂O RNase free
- Tampon (5X) first strand buffer (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
- DTT 0,1 M (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)

AATTGTGAC ACCTGATGGA TGCCCGGGGA CAGGTGGACA TCCTCAACTT 50
 ACTGCGGTGC ATTGTAGTGG ACATTTCCAA CAGACTGTTT CTAGGAGTCC 100
 CTCTCAATGA GCATGATCTG CTTCAGAAGA TTCATAAATA TTTTGACACC 150
 TGGCAGACGG TACTAATCAA ACCGatgtg tacttcagac tggcctggtg 200
 gttgCACAGG AAGCACAAGA GAGACGCTCA GGAGTTGCAG GATGCTATTG 250
 CAGCTCTGAT CGAACAGAAG AGAGTTCAGC TGACACGTGC AGAAAAATTC 300
 GACCAGCTCG ACTTCACAGC AGAGCTGATA TTTGCTCAGA GCCACGGGGA 350
 GCTGAGCACT GAGAAAGTCA GGCAGTGTGT GTTGAGATG ATAATGCGAG 400
 CTCGGACAC TCTCTCTATC AGTCTGTTCT TCATGTTGCT GTTGCTCAA 450
 CAGAATCCAG ACGTCGAATT AAAGATCCTG CAGGAAATGA ACGCTGTCT 500
 AGCGGGTGG AGCCTGCAGC ACTCACATCT GTCCGGGTC CACATTCTGG 550
 AGAGTTTAT CAACGAGTCG CTCGGGTTC ATCCGGTGT GGAATTCACC 600
 A 601

Figure 8 : Design du couple d'amorces sur la séquence du gène de l'aromatase au niveau des gonades du poisson rouge (*Carassius auratus*) (Primers express, Appleid Biosystems, Pays-Bas)

AACGAGCTGC GTGTTGCCCC TGAGGAGCAC CCTGTCTGTC TGACAGAGGC 50
 TCCCTCAAT CCAAAGCCA ACAGGGAGAA GATGACCCAG ATCATGTTTG 100
 AGACCTTCAA CACCCCTGCC ATGTATGTGG CCATCCAGGC TGTGCTCTCC 150
 CTGTATGCTT CAGGTGTAC TACTGGTATT GTGATGGACT CCGGTGATGG 200
 TGAGACCCAC ACTGTACCCA TCTACGAGGG TTATGCTCTT CCCCATGCAA 250
 TCCTGOGTCT GGATCTGGCT GGTGCTGATC TGACAGACTA CCTGATGAAG 300
 ATCTGACCG AGGTGGCTA CAGCTTCACC ACCACGGCCG AGAGAGAAAT 350
 tgtcogtgac atcaaggaga agctgtgCTA TGTGGCCCTG GACTTTGAGC 400
 AGGAGATGGG AACCGCGCC TCCTCTTCTT CTCTGGAGAA GAGCTATGAG 450
 CTCCTGACG GGCAGGTCAT CACCATGGC AATGAGCGTT TCCGTTGCC 500
 TGAGGCTCTT TTCCAGCCAT CCTTCTAGG TATGGAATCT TGCGGTATCC 550
 ATGAGACCAC CTTCAACTCA ATCATGAAGT GTGATGTGGA CATTOGTAAG 600
 GACCTGTATG CCAACACTGT GCTGTCTGGA GGTACCACCA TGTACCCCTG 650
 CATTGCTGAC CGTATGCAGA AAGAGATCAC TTCCCTTGCT CCTTCCACCA 700
 T 701

Figure 9 : Design du couple d'amorces sur la séquence de la β -actine du poisson rouge (*Carassius auratus*) (Primers express, Appleid Biosystems, Pays-Bas)

- RNAsine (40U/μl) (Promega, Madison, U.S.A.)
- dNTP mix 250 μM (Eurogentec, Seraing, Belgique)
- SuperScript II (200U/l) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
- RNase H (2U/μl) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)

Méthode:

- 1) Mélanger l'ARN traité à la DNase à l'oligo dT et centrifuger brièvement (le total du mélange doit faire 10 μl) :
 - 1 μl oligo dT (500 ng/ μl)
 - x μl d'ARN traité à la DNase
 - x μl dH₂O RNase free
- 2) Incuber le mélange (mix) 10 min à 70° C et centrifuger brièvement
- 3) Refroidir sur glace et centrifuger brièvement
- 4) Préparation du mix de réaction
 - 4 μl (5X) first strand buffer
 - 2 μl DTT 0,1 M
 - 1 μl RNAsine (40U/μl)
 - 2 μl dNTP mix
- 5) Ajouter 9 μl de réaction mix par tube et centrifuger brièvement
- 6) Incuber 2 min à 42°C
- 7) Ajouter 1 μl de SuperScript II (200U/l) et homogénéiser délicatement à l'aide d'un tips
- 8) Incuber 1 heure à 42°C et centrifuger brièvement
- 9) Stopper la réaction en incubant 15 min à 70°C et centrifuger brièvement
- 10) Ajouter 1 μl de RNase H (2U/μl) et centrifuger brièvement
- 11) Incuber 20 min à 37°C et centrifuger brièvement
- 12) Stocker à -20°C

2.3.2 PCR Real Time

a) Recherche du couple d'amorces appropriées

Le programme Primers express (Applied Biosystems, Pays-Bas) permet de choisir des couples d'amorces répondant à aux contraintes appropriées à la PCR en temps réel. La longueur de l'amplicon doit être comprise entre 50 et 150 pb afin d'obtenir une amplification optimale, celle des amorces varie entre 15 et 30 pb et leur contenu en G/C doit représenter 20 à 70% de la séquence nucléotidique. Les amorces ne peuvent contenir au maximum que 2 G et/ou C parmi les 5 derniers nucléotides à l'extrémité 3' afin de minimiser l'hybridation entre eux. De plus, la température de melting des 2 amorces doit se situer entre 58 et 60°C et celle-ci ne peut différer que de 1 ou 2°C entre les deux amorces. Les différentes amorces employées dans le cadre de ce travail, sont illustrées aux figures 8 et 9 .

b) Détermination de la concentration en amorces

Une fois la concentration optimale en ADNc définie, on procède à la détermination de la concentration optimale en amorces sens et anti-sens. Les dilutions sont 50 nM, 300 nM et 900 nM, en tout 9 combinaisons sont à tester. Ces différentes dilutions permettront de déterminer la concentration pour laquelle l'amplification des amorces est optimale (Ct faible) et où l'amplification des NTC (*No Template Control*) est minimale (Ct élevé).

Les différentes concentrations en amorces sont mélangées au mix PCR constitué de SYBR-Green PCR Master Mix (2x, Applied Biosystems, Pays-Bas) avec 5 µl d'H₂O pour les NTC ou 5 µl d'ADNc pour les tests, ceci afin d'atteindre un volume final de 25 µl.

c) Détermination de l'efficacité de la PCR

Une fois que la concentration optimale en amorces a été déterminée, différentes dilutions (1X, 10X, 100X, 1000X, 10000X) de l'ADNc de départ sont effectuées afin de déterminer l'efficacité de la PCR. A partir des Ct obtenus pour chaque dilution en ADNc de départ, une droite de régression est tracée. La pente permet de déterminer l'efficacité de la PCR ($E = 10^{-1/\text{pente}}$). Les efficacités d'amplification du gène d'intérêt et du gène de référence doivent être comparables pour permettre la normalisation. On remarquera aussi, que le Ct est inversement proportionnel à la dilution réalisée (fig. 6).

d) Quantification de l'expression des gènes

Chaque mix PCR contient :

- 2,5 µl d'amorce sens dont la concentration varie en fonction des mises au point réalisées au point *b*
- 2,5 µl d'amorce anti-sens dont la concentration varie en fonction des mises au point réalisées au point *b*
- 12,5 µl de SYBR-Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems, Pays-Bas)
- 5 µl d'ADNc ou de dH₂O pour les blancs de PCR (NTC)

L'ensemble du mix atteint un volume final de 25 µl. Le mélange est ensuite placé dans l'appareil Real Time PCR (ABI PRISM 7000) et l'amplification est réalisée durant 40 cycles.

e) Cycles Real Time PCR

- 1) Dénaturation initiale de 5 min à 95°C
- 2) Série de cycles (40 cycles)
 - dénaturation 15 sec à 94°C
 - hybridation-élongation 1 min à 65°C

f) Analyses des résultats

Il faut tout d'abord déterminer le Ct par l'ajustement du seuil de détection dans la zone exponentielle d'amplification. Ensuite, le ΔCt de chaque échantillon pour chaque gène étudié est évalué ($\Delta Ct = Ct \text{ de la condition contrôle} - Ct \text{ de la condition étudiée}$). On calcule également l'efficacité *E* d'amplification pour chaque gène ($E = 10^{-1/\text{pente de la courbe standard}}$) ; ainsi que leur $E^{\Delta Ct}$. Enfin, on normalise les résultats en effectuant le ratio de chaque $E^{\Delta Ct}$ pour les gènes d'intérêt sur l' $E^{\Delta Ct}$ d'un gène de référence ($E^{\Delta Ct} \text{ du gène d'intérêt} / E^{\Delta Ct} \text{ du gène de référence}$) (Pfaffl, 2001).

g) Vérification du produit PCR par électrophorèse en gel d'agarose

Cette technique consiste à séparer des molécules d'ADN selon leur taille sous l'action d'un champ électrique constant appliqué dans un gel d'agarose. Le pourcentage en agarose peut

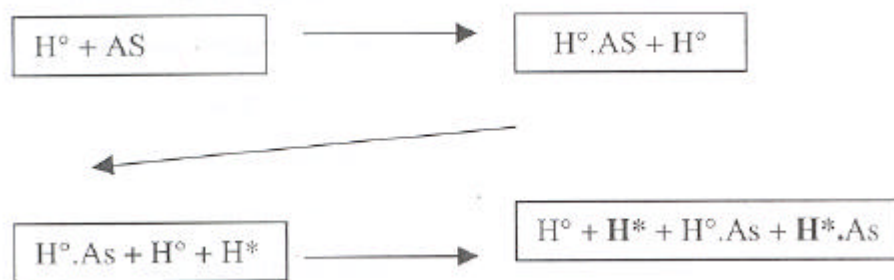


Figure 10 : Schéma illustrant le principe du dosage radioimmunologique.

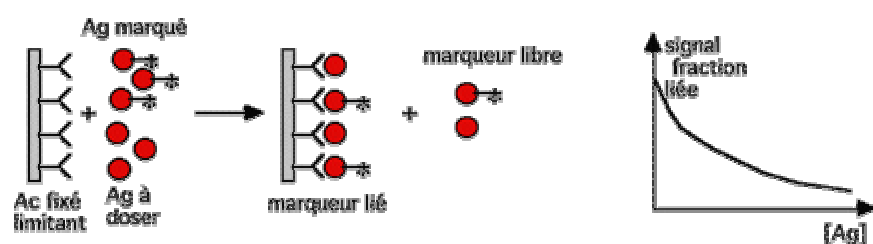


Figure 11 : L'antigène à doser entre en compétition avec l'antigène marqué pour la liaison à l'anticorps ; la totalité des sites anticorps disponibles est liée. On mesure la fraction liée qui diminue exponentiellement avec la concentration en Ag à doser.

(<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/>)

être modifié en fonction des tailles respectives des fragments à séparer. Des gels de haut pourcentage en agarose permettent de séparer des fragments d'ADN de petite taille et inversement. La taille des différents fragments d'ADN tests est estimée en faisant co-migrer un étalon constitué de fragments d'ADN de tailles connues. Pour visualiser les fragments d'ADN dans le gel, on ajoute une solution de bromure d'éthidium, molécule qui, en s'intercalant entre les bases appariées de l'ADN et sous illumination aux ultraviolets, devient fluorescente.

Matériel :

- Cuve électrophorèse (Horizon 11-14, Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)
- Générateur EPS 500/400 (Pharmacia, Suède)
- Appareil photo : Kaiser RA1 + Photo-pront IP-001-SD (Vilber-Lourmat, France)
- Film K65HM (Mitsubishi, Japon) + imprimante P91 (Mitsubishi, Japon)
- Lampe U.V. (Vilber-lourmat, France)
- TBE 1x (Tris 1 M, acide borique 0,9 M ; EDTA 0,01 M), stock TBE 10x (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Bromure d'éthidium, solution stock de 500 µg/ml (Sigma, St Louis, USA)
- Agarose (Ultra Pure Grade Agarose, Bio-Rad, Richmond, USA)
- Marqueur ADN de poids moléculaire utilisé :
 ? 100 bp DNA Ladder (Promega, Madison, USA) : fragments à 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

Méthode :

- 1) Porter à ébullition 2 g d'agarose dans 100 ml de TBE 1x jusqu'à obtenir une solution limpide.
- 2) Ajouter le bromure d'éthidium à cette solution (concentration finale = 100ng/µl)
- 3) Couler sur le support *ad hoc* muni de peigne(s) et laisser refroidir
- 4) Immerger le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE 1x
- 5) Déposer dans les puits du gel les échantillons auxquels on a préalablement ajouté le tampon de migration
- 6) Faire migrer à un voltage compris entre 80 et 120 V. les fragments d'ADN, chargés négativement, se déplacent vers l'anode, alors que le bromure d'éthidium libre en excès, chargé positivement migre vers la cathode.
- 7) Arrêter l'électrophorèse et visualiser les différents fragments dans le gel sous une illumination aux ultraviolets

2.4 Dosage des hormones sexuelles : l'œstradiol et la 11-kétotestostérone

Le dosage des hormones sexuelles est réalisé selon un dosage radio-immunologique, dénommé : RIA (radio immunoassay). Cette technique consiste à créer une compétition entre une hormone marquée (**H***) par un isotope radioactif (H^3 ou I^{125}) et une hormone froide (H^o) de concentration connue (standard) ou inconnue (échantillon) et ce, vis-à-vis d'un anticorps spécifique (As). Les concentrations plasmatiques en E_2 et en 11-KT a été déterminée selon la méthode de Fostier et Jalabert, 1986. Les figures 10 et 11 illustrent le principe du dosage RIA utilisé.

2.4.1 Extraction des stéroïdes

Premièrement, on procède à une double extraction de l'hormone à doser. Cette étape est surtout utile dans le cas des stéroïdes car elle permet, par addition du solvant, de produire une rupture des liaisons hormones-protéines.

Méthode d'extraction par hormone :

- 1) Prélever 50 µl de plasma
- 2) Ajouter 1 ml de solvant (cyclohexane/éthylacétate ; dans les proportions 50:50)
- 3) Agiter pendant 1 min au vortex
- 4) Décanter pendant 1h à -20°C
- 5) Récupérer la phase organique par retournement des tubes (travailler à 4°C)
- 6) Recommencer les points 1) , 2), 3), et 4) sur le culot
- 7) Evaporer la phase organique dans une étuve sous-vide pendant approximativement 90 min
- 8) Boucher les tubes et les conserver à -20°C si le dosage n'est pas réalisé tout de suite

2.4.2 Compétition, incubation

L'extraction terminée, on effectue la compétition entre l'hormone froide (standard ou échantillon) et l'hormone marquée (H^3) avec l'anticorps spécifique. L'hormone froide est sous deux formes : liée à l'anticorps ou libre. La quantité d'anticorps et d'hormones marquées restant constantes, toute augmentation d'hormones froides va entraîner une réduction d'hormones marquées qui se fixent sur l'anticorps. En séparant l'hormones marquées liées à l'anticorps de l'hormones marquées libres, on peut, par la mesure de la radioactivité de l'une de ses fractions, calculer la concentration en hormones froides dans l'échantillon.

Une courbe standard permet d'établir la décroissance du pourcentage d'hormones marquées qui se fixent à l'anticorps en présence d'une quantité progressivement croissante d'hormones froides.

Matériel :

Anticorps spécifique

Hormone marquée (H^3)

Tampon phosphate

Tampon phosphate gélatiné (TPG)

Tampon polyéthylèneglycérol 25% (PEG)

Méthode :

1. Ajouter 300 µl de TPG 0,01 M dans chaque tube contenant l'extraction
2. Passer au vortex
3. Reprendre 100 µl d'échantillon en duplicat dans des tubes en polystylène
4. Ajouter 100 µl d'anticorps dans les tubes y compris les standards ; les tubes servant à la mesure de la radioactivité naturelle (back ground) sont exclusivement composés de 200 µl de TPG et 100 µl d'hormone marquée
5. Passer au vortex
6. Ajouter 100 µl d'anticorps dans tous les tubes sauf dans deux pour l'évaluation de la fixation résiduelle (radioactivité naturelle ou «back ground »). Pour ces deux tubes : 200 µl de TPG ou 100 µl de TPG + 100 µl de gamma-globulines
7. Passer au vortex

8. Ajouter 100 µl de traceur, soit d'hormone radioactive (marquée au H³) à tous les tubes et prévoir deux supplémentaires avec seulement du traceur pour l'évaluation de la fixation totale (TC)
9. Passer au vortex
10. Incuber pendant 60 min à 37°C
11. Incuber pendant 2 heures à 4°C
12. Ajouter 2 ml de PEG 25 %
13. Incuber 12 heures à 4°C
14. Centrifuger à 3500 x g pendant 30 min à 10°C
15. Eliminer le surnageant par retournement des tubes
16. Reprendre par 100 µl d'éthanol absolu (dans tous les tubes y compris le TC)
17. Passer au vortex
18. Ajouter 2,5 de liquide scintillant (Ecoscint A)
19. Boucher les tubes et agiter vigoureusement
20. Chauffer à température ambiante
21. Passer au compteur à scintillation

Résultats :

La dernière partie du dosage consiste à mesurer la radioactivité en coups par minute (cpm) émise par chacun des tubes. Cette mesure est effectuée par un compteur β (Beckman LS 6000IC). Un système de calcul élaboré par Fostier et Jalabert (1986) permet de transformer les valeurs exprimées en cpm en pg/tube. La quantité réelle d'hormones présente dans l'échantillon est calculée selon la formule suivante :

$$(\text{pg/ml}) = \frac{(\text{pg/tube}) * \text{quantité de tampon reprise des stéroïdes extraits } (\mu\text{l})}{\text{quantité de plasma utilisée pour le dosage } (\mu\text{l}) * \text{quantité de plasma extraite } (\mu\text{l})}$$

Notons que les mesures sont faites en duplicats pour chacun des échantillons et en triplicats pour chacun des points de la courbe standard. De plus, pour chaque hormone, on réalise une mesure de la radioactivité naturelle (back ground) ainsi qu'une mesure de la fixation totale ;

Les protocoles des différents tampons ainsi que les courbes standards sont présentés en annexe.

IV

Résultats et discussion

IV Résultats et discussion

1. Introduction

L'entièreté du dispositif technique de l'expérience n'a posé aucun problème durant tout son déroulement. Quant au matériel biologique aucune anomalie n'a été décelée : bonne croissance des poissons, réflexe d'alimentation normale. De plus, aucune pathologie n'a été observée excepté quelques problèmes mineurs en début d'expérience chez les poissons témoins.

La première partie du mémoire consistera à mettre au point une technique permettant d'évaluer l'expression de transcrits du gène *CYP19a*. Ensuite, en nous appuyant sur ces mises au point nous pourrons évaluer l'expression de transcrits d'ADNc du *CYP19a* dans nos conditions expérimentales. Enfin, nous comparons les niveaux de transcrits avec les résultats de dosage stéroïdiens.

2. Mises au point de la technique de RT-PCR en temps réel sur des transcrits de *CYP19a*

La mise en évidence de la transcription d'un gène peut être étudiée à l'aide de deux techniques couramment utilisées que sont le Northern-blot et la réaction en chaîne de polymérisation suite à une rétro-transcription d'ARN (RT-PCR) (Bustin, 2000).

Le faible seuil de sensibilité de cette technique et sa lourdeur, en font une méthode de plus en plus délaissée au profit d'une technique beaucoup plus sensible et rapide : la RT-PCR.

2.1 Détermination du couple d'amorce spécifique de *CYP19a* et de la β -actine

La détermination du couple d'amorce requiert un certain nombre de contraintes propre à la technique PCR Real Time. (cfr. : point 2.3.2 a) de Matériel et méthodes). Le design de ces amorces a été déterminé au moyen du logiciel 'Primer Express' (Applied Biosystems, Pays-bas). Un gène est constitué de régions codantes (exons) et de régions non-codantes (introns). Dans la mesure du possible, nous avons veillé à choisir des amorces situées dans deux exons différents. Cette précaution permet de dévoiler une contamination éventuelle de l'ADNc par de l'ADN génomique, par discrimination de la taille de l'amplicon généré lors de la PCR. En ce qui concerne la séquence du gène *CYP19a* la limite exon-exon est connue mais la taille exacte des introns reste ignorée. En ce qui concerne notre gène de référence, la β -actine, la limite exon-exon sur la séquence du poisson rouge (*Carassius auratus auratus*) reste inconnue à ce jour, ce qui ne nous a pas permis de prendre cette précaution pour le choix des amorces spécifiques de la β -actine.

2.1.1 séquence des amorces

a) *CYP19a* :

Sens	5' TGGCAGACGGTACTAATCAAACC 3'
Anti-sens	5' AGCTGCAATAGCATCCTGCAA 3'

b) β -actine :

Sens 5' CTGACCGAGCGTGGCTACA 3'
Anti-sens 5' GGTTCCTCATCTCCTGCTCAA 3'

2.1.2 Caractéristiques particulières des amorces

Les amorces spécifiques du gène de l'aromatase *CYP19a* génèrent un amplicon de 105 pb et a une température de melting de 81°C. Les amorces spécifiques de la β -actine génèrent un amplicon de 111 pb, la température de melting est de 83°C.

Lors du design des primers, nous prenons aussi la précaution de comparer la séquence de l'amplicon avec une banque de données, pour s'assurer que la séquence soit bien spécifique (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Dans un deuxième temps, nous avons vérifié, à l'aide du logiciel 'Amplify' que les amorces ne puissent pas s'hybrider entre elles, le cas échéant, il y aurait formation de dimères d'amorces.

2.2 Détermination de la spécificité de la PCR

Nous avons utilisé deux techniques pour démontrer la spécificité de l'amplification de notre gène d'intérêt.

La première consiste à réaliser une courbe de dissociation juste après la PCR en augmentant progressivement la température du produit de l'amplification de 60°C à 95°C ce qui dénature les brins d'ADN bicaténaire. La dénaturation a pour effet de libérer les molécules de SYBR-GREEN en solution, entraînant une diminution brutale de l'intensité de la fluorescence. La dérivée de la courbe d'intensité de la fluorescence en fonction de la température fait apparaître un pic de dissociation dont la position sur l'axe des température est caractéristique de l'amplicon généré, ce qui permet de distinguer les produits d'amplification aspécifiques dénaturés à plus basse ou plus haute température. Ce pic de dénaturation se situe à une température correspondant à la température de melting (T_m) de l'amplicon. Cette T_m représente la température où 50 % des brins d'ADN sont dénaturés. On compare ensuite, la T_m expérimentale à la T_m théorique afin de vérifier que l'amplicon obtenu correspond à celui attendu. Cette méthode nous permet ainsi de voir s'il y a contamination des échantillons ou s'il y a formation de dimères d'amorces.

La deuxième technique consiste à faire migrer les produits d'amplification sur gel d'agarose. Cette technique appelée 'Electrophorèse' va nous permettre de visualiser si la taille de l'amplicon obtenu après PCR correspond bien à la taille de l'amplicon ciblé. Elle permet aussi de montrer une éventuelle contamination des blancs PCR.

Etant donné la différence de structure et de composition des deux types de tissus (ovaire et testicule), les conditions optimales d'extraction de l'ARN sont différentes dans les deux situations. Afin de s'assurer de la pureté de l'ARN obtenu (absence de contamination par de l'ADN génomique), nous avons vérifié la spécificité des amplicons obtenus en réalisant une courbe de dissociation et une électrophorèse des produits PCR.

2.2.1 Mises au point réalisées sur du tissu de gonade femelle

2.2.1.1 Détermination de la spécificité de la PCR après extraction de l'ARN total au Tripure®

Nous avons dans un premier temps, réalisé une amplification du gène d'intérêt et du standard à partir d'ARN total extrait par la méthode Tripure®.

a) Courbe de dissociation du gène *CYP19a*

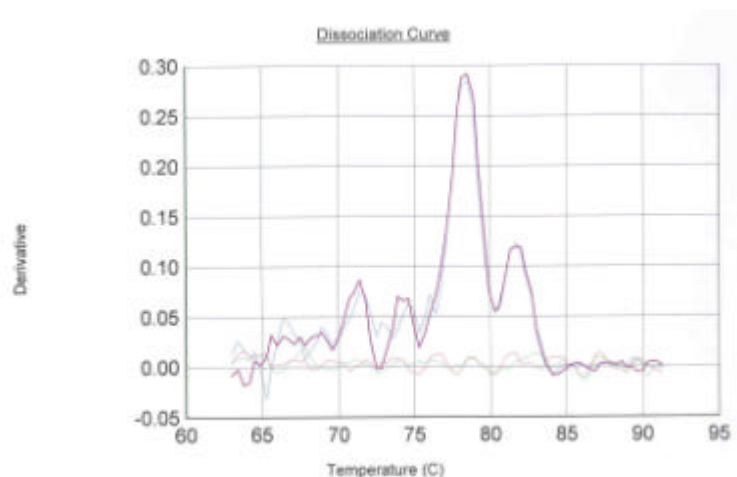


Figure 2 : Courbe de dissociation du *CYP19a*. La température de melting du *CYP19a* est de 81°C.

b) Courbe de dissociation de la β -actine

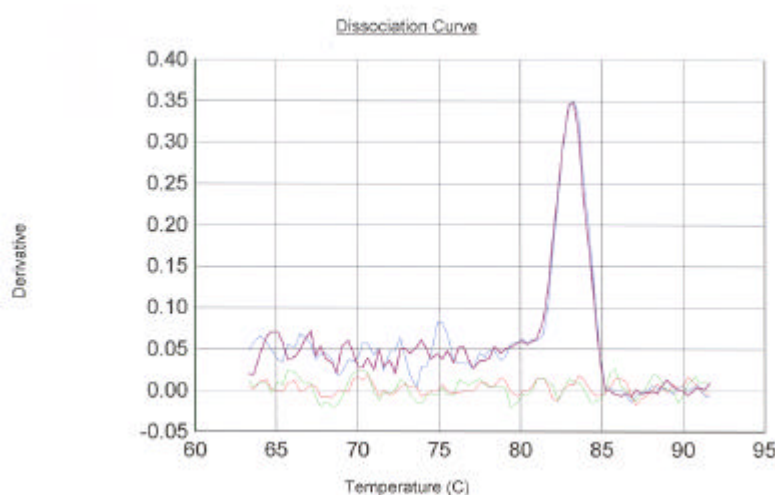


Figure 3 : Courbe de dissociation de la β -actine. La température de melting de la β -actine est de 83°C.

La courbe de dissociation obtenue suite à la dénaturation de l'amplicon généré au moyen des amorces choisies pour amplifier un fragment de l'ADNc de l'aromatase (fig. 2) montre

plusieurs pics, dont un pic majoritaire correspondant à une T_m différente de celle attendue pour le fragment d'intérêt (81°C). Deux hypothèses permettent d'expliquer ce résultat :

- Soit, il y a formation de dimères d'amorces
- Soit, il y a contamination par de l'ADN génomique

Nous avons rejeté la première hypothèse car, en cas de formation de dimères d'amorces, le pic aurait été plus petit et la T_m aurait dû se situer aux alentours de 75°C.

En ce qui concerne le gène de la β -actine, nous n'observons aucun pic aspécifique (fig. 3). Ceci s'explique facilement par le fait que vraisemblablement, les amorces choisies se situent dans un même exon. Les limites exon-exon n'étant pas encore connue pour ce gène. De ce fait, la β -actine n'étant d'aucun intérêt pour ces mises au point, seuls les résultats concernant l'aromatase seront présentés dans la suite des résultats de ces mises au point de la PCR en temps réel.

Pour tester la deuxième hypothèse, nous avons réalisé une électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR (Fig.4).

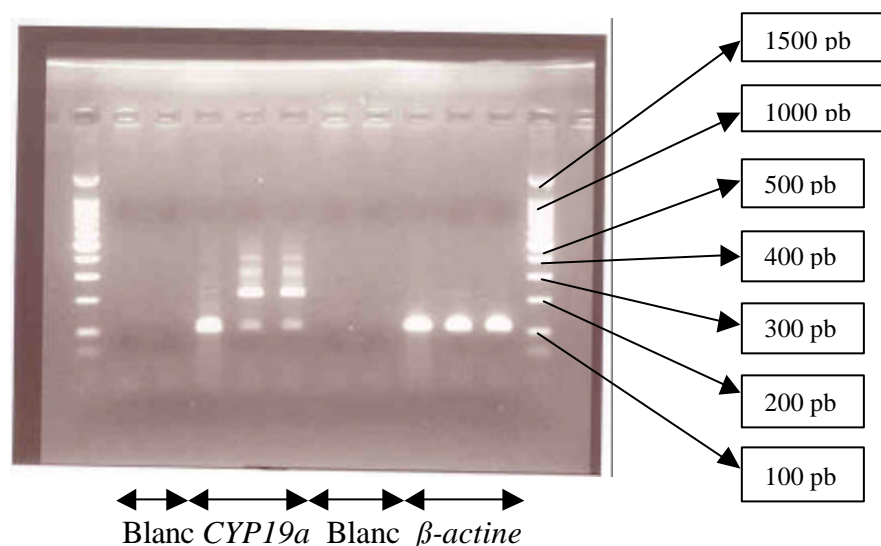


Figure 4 : Electrophorèse des produits PCR du *CYP19a*, de la β -actine et des blancs PCR.

Nous observons que les amplicons générés au moyen des amorces *CYP19a* sont constitués de différentes bandes de tailles supérieures à la taille attendue par l'amplification du fragment d'ADNc, renforçant l'idée qu'il s'agit d'amplicons générés à cause d'une contamination des échantillons d'ADNc par de l'ADN génomique. La β -actine présente les résultats attendus mais ce résultat n'est pas informatif en terme de contamination par de l'ADN génomique puisque les amorces se situent dans le même exon. Les blancs, eux, ne présentent aucune amplification.

Sur base de ces premiers résultats, nous avons traité les extraits d'ARN total avec de la DNase, afin de dégrader l'ADN génomique.

c) Courbe de dissociation du gène *CYP19a* à partir d'un extrait d'ARN traités à la DNase

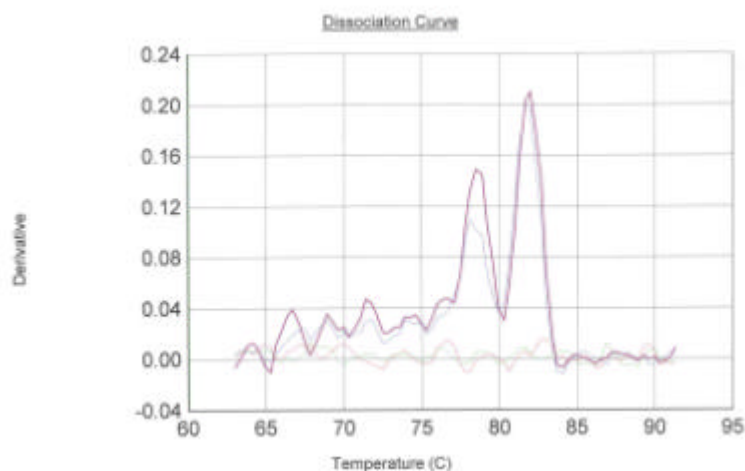


Figure 5 : Courbe de dissociation du *CYP19a*, Tm : 81°C.

Après traitement à la DNase, nous sommes parvenus à limiter le pic aspécifique et à améliorer l'efficacité de l'amplification de notre gène d'intérêt (fig. 5). N'ayant pas su éliminer la contamination par de l'ADN génomique de manière significative, nous avons alors décidé de changer de technique d'extraction. Nous avons laissé tomber une technique de séparation de phase au profit d'une technique où l'ARN se fixe sur une colonne ensilice et subit une succession de lavage.

2.2.1.2 Détermination de la spécificité de la PCR après extraction de l'ARN total au moyen du kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System, Invitrogen, Carlsbad, USA

a) Courbe de dissociation du gène *CYP19a*

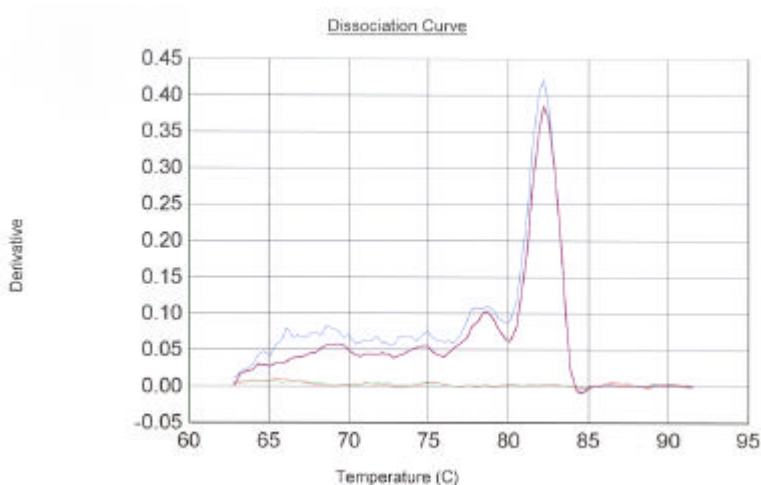


Figure 6 : Courbe de dissociation du gène *CYP19a*, Tm : 81°C.

L'ARN total extrait au moyen du kit Invitrogen, a également subi un traitement à la DNase. On observe encore un léger pic de dissociation aspécifique. Nous avons tenté d'augmenter le temps du traitement à la DNase (2x20 min) afin d'éliminer complètement la contamination,

cette prolongation du temps de réaction n'a donné aucune amélioration. Nous avons alors décidé de faire migrer ces produits PCR sur gel d'agarose afin de détecter une éventuelle bande non spécifique.

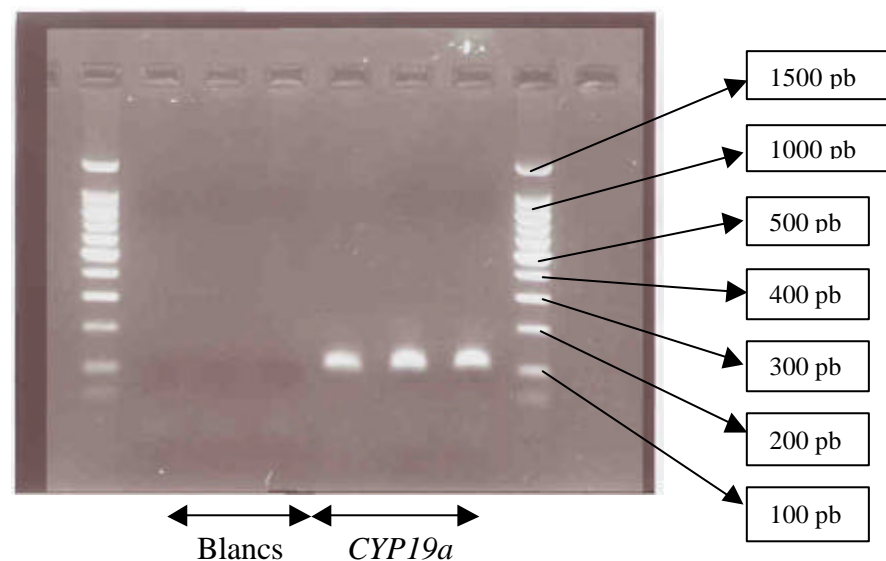


Figure 7 : Electrophorèse des produits PCR du *CYP19a* et des blancs PCR.

Sur le gel, on ne constate aucune bande parasite. De plus, la taille de la bande correspond bien à celle attendue, ce qui signifie que l'amplicon obtenu est bien celui attendu et qu'il est pratiquement pur. Notons aussi, que les blancs de PCR sont bien dépourvus d'amplification non désirée. Nous conservons donc ces conditions d'extraction d'ARN des gonades femelles dans la suite de ce travail, à savoir, extraction de l'ARN à l'aide du kit Micro-to-Midi Total RNA Purification System (Invitrogen, Carlsbad, USA) puis, traitement de l'ARN avec une DNase.

2.2.2 Mise au point réalisée sur du tissu de gonades mâles

Pour l'ARN total provenant des tissus de gonades mâles, nous nous sommes dans un premier temps, appuyés sur les conditions d'extraction optimisées pour les gonades femelles.

a) courbe de dissociation du *CYP19a*

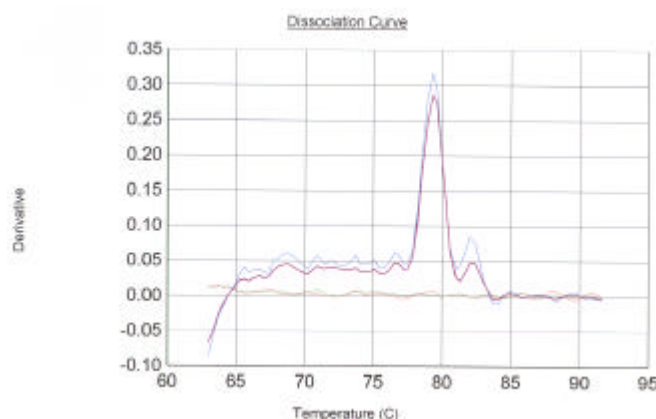


Figure 8 : Courbe de dissociation du gène *CYP19a*, Tm : 81°C.

A notre grand étonnement, nous nous retrouvons face à un pic majoritaire de Tm différent de celui attendu (fig. 8). Nous sommes à nouveau confrontés à une contamination par de l'ADN génomique. Nous en avons déduit que le problème devait provenir de l'extraction. En effet, la nature du tissu des testicules était très différente de celle des ovaires, nous avons constaté des différences lors de l'homogénéisation du tissu dans le tampon de lyse. Nous avons alors tenté d'optimiser cette extraction en soumettant le tissu à broyage mécanique plus drastique. Après avoir broyé une première fois à l'aide d'une tige RNase free, nous l'avons fait passer à travers une aiguille de seringue afin d'améliorer l'homogénéisation du tissu.

b) courbe de dissociation du gène *CYP19a*

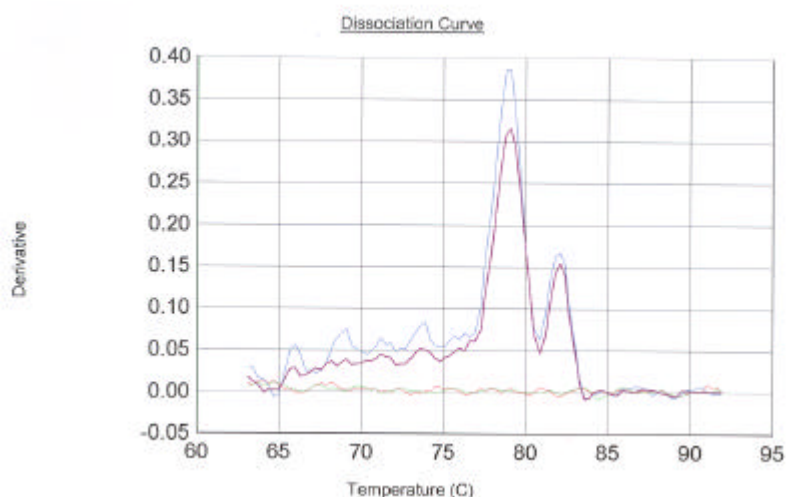


Figure 9 : Courbe de dissociation du gène *CYP19a*, Tm : 81°C.

Vu la courbe de dissociation obtenue avec ces échantillons (fig. 9), cette opération ne suffit pas à améliorer le résultat puisque le pic de dissociation dû à la présence d'ADN génomique est toujours bien présent. Toutefois, il faut savoir que la quantité d'ARN obtenue après extraction à partir de 100 mg de tissu de gonades mâles est très faible. Nous pensons que la faible quantité d'acides nucléiques déposé sur la colonne en silice, n'est pas optimale pour obtenir une bonne séparation de ARN et de l'ADN génomique. Pour cela, nous avons décidé

d'augmenter la quantité de tissu (200 mg au lieu de 100 mg) à broyer et ce pour permettre la fixation d'une quantité plus importante d'ARN total sur la colonne en silice et permettre l'élution de l'ADN génomique par les différents lavages.

c) courbe de dissociation du gène *CYP19a*

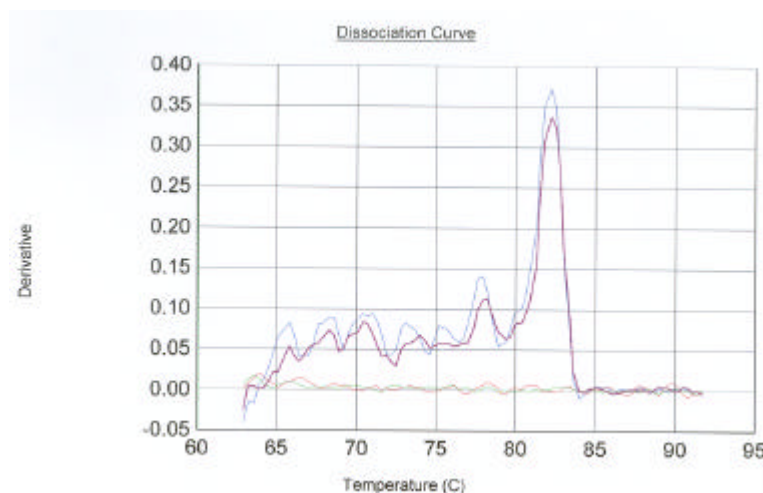


Figure 10 : Courbe de dissociation du gène *CYP19a*, T_m : 81°C.

Les résultats obtenus dans ces conditions montrent une nette amélioration, mais restent cependant insatisfaisant (fig. 10). Faute de temps, nous n'avons pu poursuivre l'optimisation de l'extraction de l'ARN total à partir de tissu de gonades mâles.

2.3 Détermination de la concentration des amorces

Une fois que la séquence des amorces a été définie selon les contraintes imposées par le logiciel *Primer Express*, différentes concentrations en amorces doivent être testées afin d'obtenir la meilleure amplification possible.

Nous avons utilisé neuf combinaisons de concentration en amorces sens et anti-sens recommandées par le protocole de la PCR en temps réel (Applied Biosystems, Pays-Bas). Ces concentrations sont : 50nM/50nM, 50nM/300nM, 50nM/900nM, 300nM/300nM, 300nM/50nM, 300nM/900nM, 900nM/900nM, 900nM/50nM, 900nM/300nM. Le cycle seuil ou C_t ('*threshold cycle*') des différentes combinaisons sont comparés. Le C_t indique le cycle à partir duquel la courbe de fluorescence croise la droite correspondant au seuil de détection. Ce seuil de détection représente une intensité de fluorescence significativement plus élevée que le niveau de base (Salmon, 2002) (fig. 6 de matériel et méthode). La concentration optimale est celle qui permet une forte amplification de l'ADN (C_t faible) sans avoir d'amplification au niveau du blanc. Pour aucune des concentrations en amorces testées, nous n'avons obtenu d'amplification des blancs de PCR (NTC), ce qui signifie, qu'il n'y a pas de formation de dimères d'amorces.

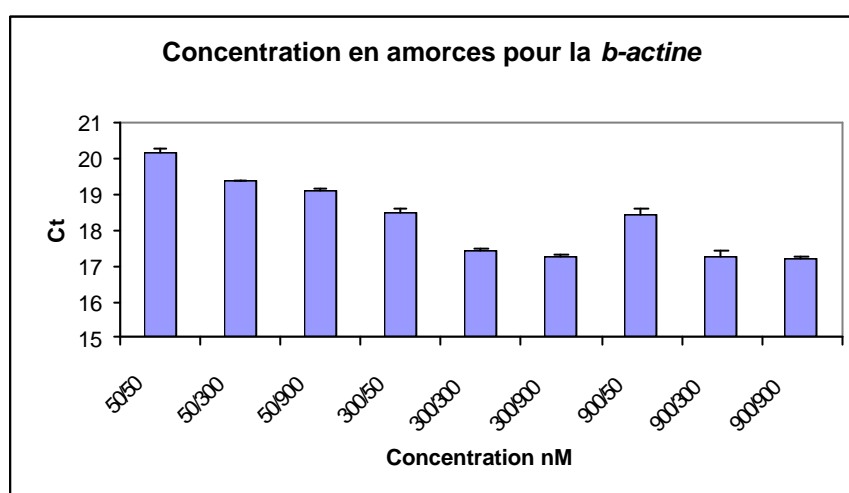
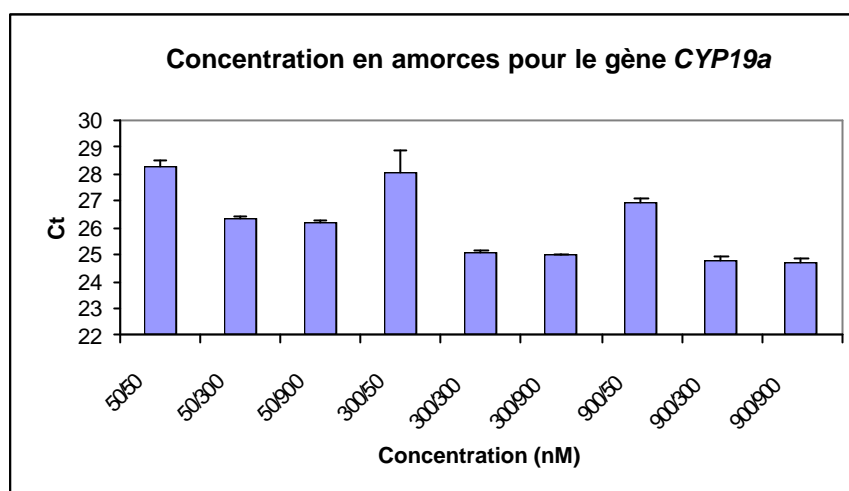


Figure 11 : Détermination de la concentration optimale pour le couple d’amorce du gène *CYP19a* et de la *β-actine*. Analyse des 9 combinaisons possibles de concentration en amorce sens et anti-sens afin de déterminer la concentration pour laquelle nous avons une forte amplification de l’ADNc (Ct faible).

Suite à ces résultats, nous avons pu déterminer la concentration optimale des amorces sens et anti-sens pour les gènes dont nous voulons étudier le niveau d’expression.

Tableau 1 : Concentrations optimales déterminées pour chaque couples d’amorces utilisé dans ce travail.

Gènes	Amorces sens	Amorces anti-sens
<i>CYP19a</i>	300 nM	300 nM
<i>β-actine</i>	300 nM	300 nM

2.4 Détermination de la l'efficacité de la PCR

Une fois que la concentration optimale en amorces a été déterminée, on teste cette concentration sur de l'ADNc dilué (1X, 10X, 100X, 1000X et 10000X) afin de déterminer l'efficacité de la PCR pour chaque transcrit étudié. Chaque dilution sera caractérisée par une amplification dont le Ct sera particulier à la concentration en ADNc. L'efficacité est représentée par la formule $E = 10^{-1/\text{pente}}$ de la droite passant par les différentes valeurs de Ct en fonction du logarithme de la concentration. Cette efficacité, propre à chaque couple d'amorces est indispensable pour la quantification du niveau d'ARN.

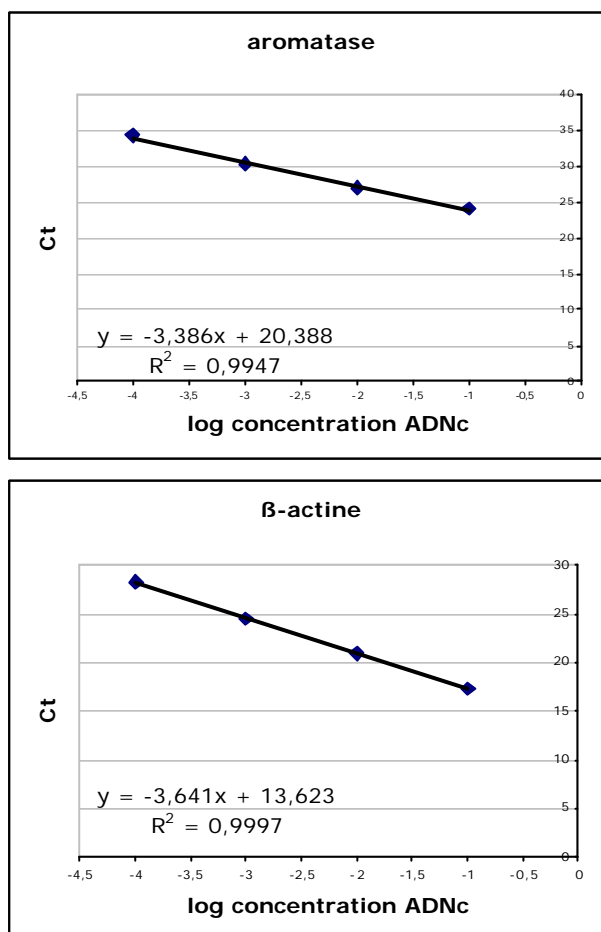


Figure 12 : Détermination de l'efficacité de la PCR pour les deux transcrits étudiés.

Ces graphes ont permis de déterminer l'efficacité de la PCR propre à chaque couple d'amorces.

Tableau 2 : Une courbe standard est réalisée pour chaque gène partir des différentes valeurs de Ct en fonction du logarithme de la concentration. L'efficacité est représentée par la formule $E = 10^{-1/\text{pente}}$ de la courbe standard. Ce tableau reprend la pente et l'efficacité propre à chaque gène.

Gènes	Pente	Efficacité
<i>CYP19a</i>	-3,386	1,97
<i>β-actine</i>	-3,641	1,88

Ces différentes mises au point nous permettent maintenant, d'étudier l'expression de notre gène d'intérêt dans nos conditions expérimentales.

Lors de cette étude, nous avons comparé les niveaux relatifs de transcrits du gène de l'aromatase provenant de gonades de femelles de poisson rouge (*Carassius auratus*) soumis à différentes concentrations d'atrazine (0 µg/l, 100 µg/l et 1000 µg/l) par rapport à des poissons contrôles. Ceci nous permet de voir l'éventuel effet de l'atrazine sur l'expression de l'aromatase par rapport à l'expression chez des individus sains.

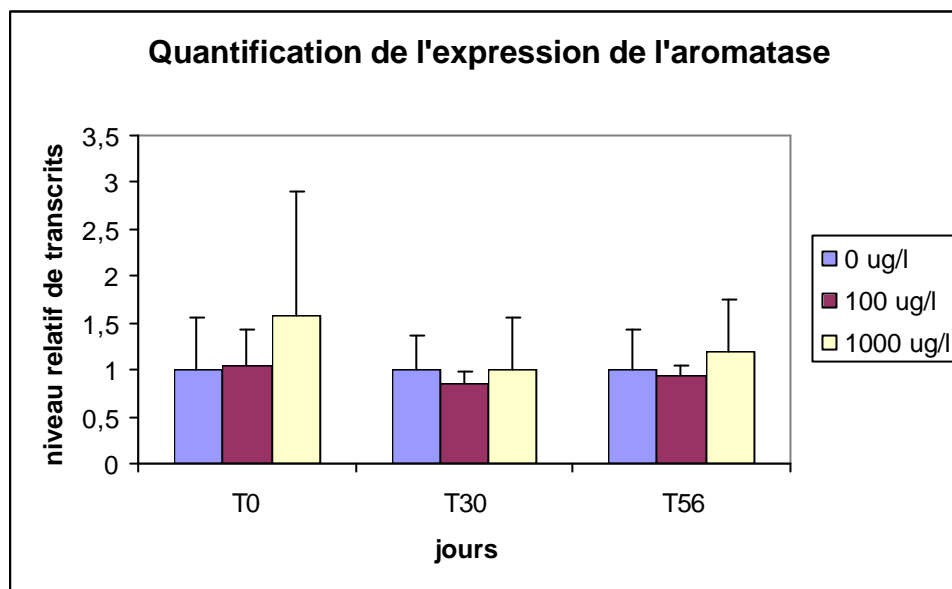


Figure 13 : Etude du niveau relatif de transcrits de *CYP19a* par PCR en temps réel. Les résultats ont été normalisés à l'aide du gène de référence (la β -actine). Les moyennes et les écarts-types par dose et par temps ont été réalisés sur 4 individus femelles.

Grâce à ces résultats, nous pouvons analyser les niveaux relatifs de transcrits du gène de l'aromatase *CYP19a* pour les individus contaminés à une concentration de 100 µg/l et 1000 µg/l par rapport à des individus contrôles. Dans notre cas, nous ne constatons aucun effet de l'atrazine sur l'expression de l'aromatase.

Ceci se recadre bien dans notre étude et l'étude précédente de Spano' *et al.* (2003), car il semblerait que l'atrazine ne touche pas les concentrations plasmatiques des stéroïdes sexuels chez les femelles. Par contre, chez les mâles de poissons rouges, Spano' *et al.* (2003) ont constaté une diminution du substrat de l'aromatase et une augmentation de son produit, qui suggère une augmentation de son activité. D'autres études ont également décelé une augmentation de l'activité de l'aromatase chez les individus mâles (Crain *et al.*, 1999), (Hayes *et al.*, 2002). Peu d'études se sont focalisées sur l'expression du gène de l'aromatase. Seule, l'étude de Sanderson *et al.* (2000) montre une corrélation entre l'augmentation de l'activité de l'aromatase et l'augmentation de l'ARNm mais suite à une intoxication d'une lignée cellulaire humaine avec du triazine.

3. Relation entre l'indice gonadosomatique et les niveaux relatifs de transcrits d'aromatase

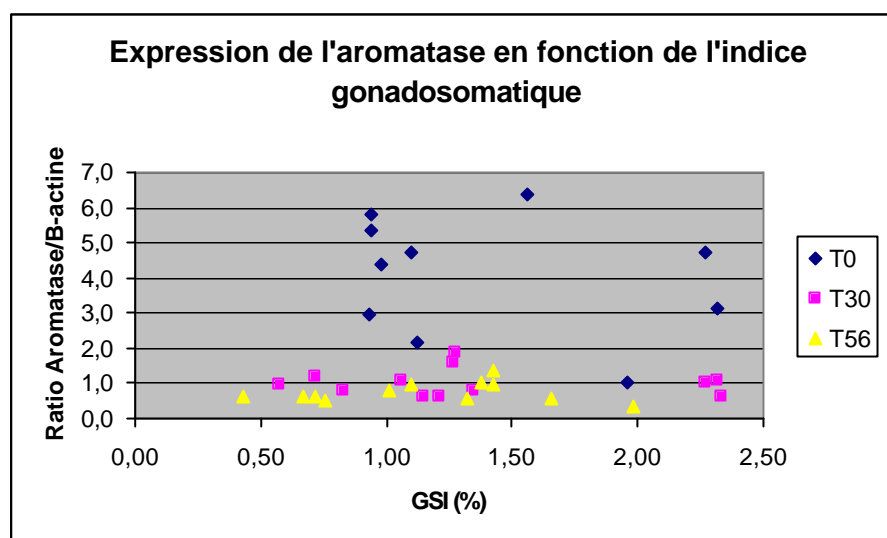


Figure 14 : Expression de l'aromatase en fonction du GSI chez tous les individus femelles dont nous avons évalué l'expression de l'aromatase.

Ayant constaté une certaine variabilité interindividuelle dans l'expression de transcrits du gène de l'aromatase, nous avons tenté de mettre en relation l'expression du gène en fonction du GSI. Aucune relation, n'a pu être décelée, ni chez les témoins, ni chez les intoxiqués.

4. Dosage des hormones sexuelles : l'œstradiol et la 11-kétotestostérone

Dans le cadre du dosage de l'œstradiol et de la 11-kétotestostérone, nous nous intéressons à l'évolution de la concentration de ces hormones au cours du temps et suite à une contamination chronique d'atrazine à doses sublétales (100 µg/l et 1000 µg/l). Le dosage RIA a été effectué sur l'ensemble des poissons (162 individus).

Toutes les données ont été analysées par un traitement statistique, *t* de student, qui consiste à comparer les moyennes deux à deux.

4.1 La 11-kétotestostérone

L'évaluation de la 11-kétotestostérone a été réalisée chez les mâles et les femelles contrôles ainsi que chez les mâles et les femelles intoxiqués à 100 µg/l et 1000 µg/l d'atrazine après 30 et 56 jours de contamination. Un minimum de 4 observations a été observé pour chaque circuit de contamination (0 µg/l, 100 µg/l et 1000 µg/l) et à chaque date de prélèvement. L'ensemble des données nous ont permis, sur base d'un calcul de moyennes et d'écarts-types, de caractériser le profil de la concentration en 11-kétotestostérone chez les mâles et les femelles témoins, contrôles et intoxiqués tout au long de l'expérience.

a) Chez les individus mâles

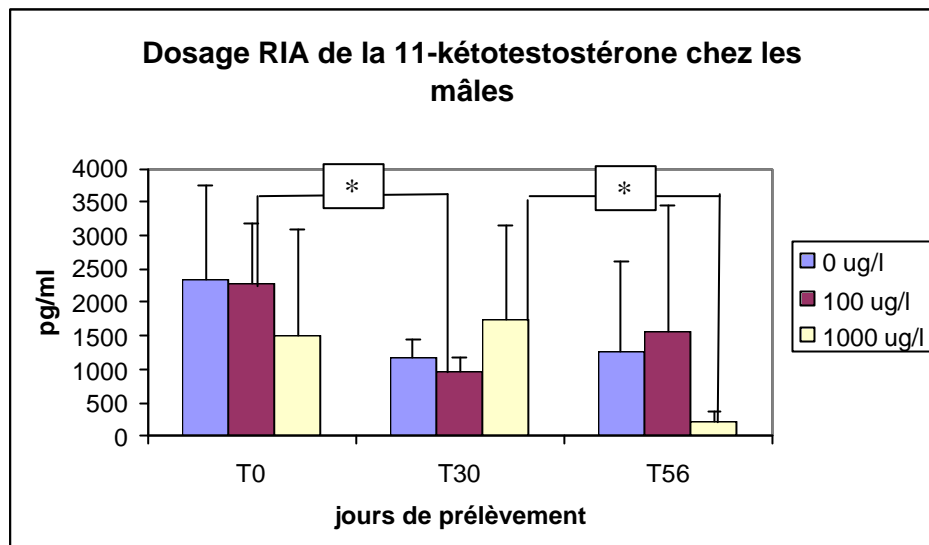


Figure 15 : Evolution de la 11-kétotestostérone chez les mâles pendant les 56 jours de contamination. Les valeurs sont exprimées en moyennes et en écarts-types.

Les niveaux plasmatiques en 11-KT chez les mâles contrôles se situent entre 207 et 4621 pg/ml.

L'analyse statistique montre qu'il y a un effet temps sur la concentration en 11-kétotestostérone à 1000 $\mu\text{g/l}$ (* $P < 0,05$) au jour T_{30j} et T_{56j} . Nous constatons également un effet temps à une contamination de 100 $\mu\text{g/l}$ (* $P < 0,05$) au jour T_{0j} et T_{30j} . Nous n'avons pu montrer aucun effet dose sur la concentration en 11-KT. Nous pouvons cependant, observer une tendance d'un effet dose à la concentration de 1000 $\mu\text{g/l}$ au T_{56j} . Si, certes, dans notre cas nous observons une tendance, celle-ci pourrait être masquée par l'importante variabilité interindividuelle. Une durée plus longue d'intoxication, nous aurait peut-être permis de voir un effet significatif sur la 11-KT de juvéniles de poissons rouges.

b) Chez les individus femelles

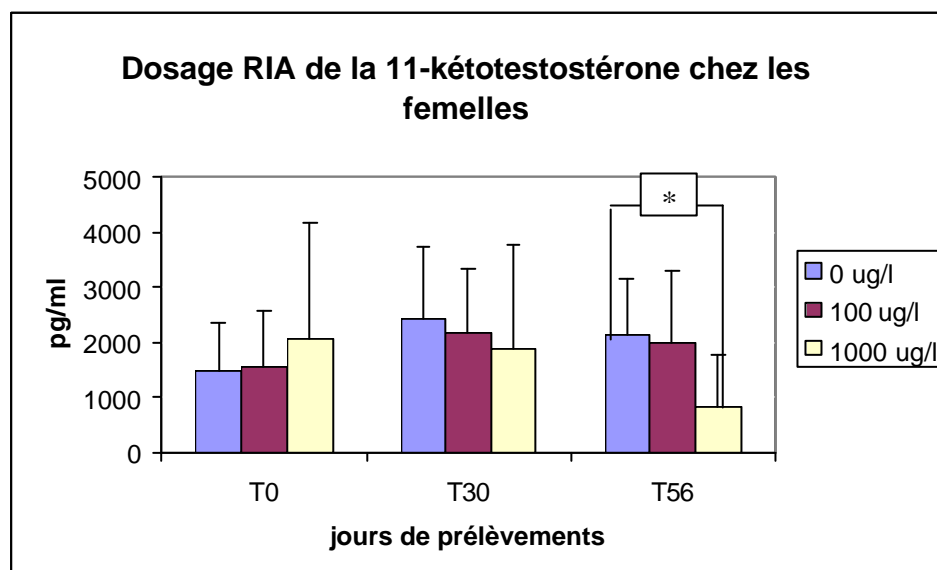


Figure 16 : Evolution de la 11-kétotestostérone chez les femelles pendant les 56 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes et écarts-types.

Les niveaux plasmatiques en 11-KT chez les femelles contrôles se situent entre 538 et 6026 pg/ml.

En ce qui concerne les femelles, le test *t* de student ne constate aucun effet du temps. Par contre, au T_{56j} , on constate un effet dose pour une concentration en atrazine de 1000 µg/l (* $P < 0,05$).

4.2 L'œstradiol

Comme pour l'évaluation de la 11-kétotestostérone, le dosage de l'œstradiol a été réalisé chez les mâles et les femelles contrôles ainsi que chez les mâles et les femelles intoxiqués à 100 µg/l et 1000 µg/l d'atrazine après 30 et 56 jours de contamination. Un minimum de 2 observations a été observé pour chaque circuit de contamination (0 µg/l, 100 µg/l et 1000 µg/l) et à chaque date de prélèvement. L'ensemble des données nous ont permis, sur base d'un calcul de moyennes et d'écarts-types, de caractériser le profil de la concentration plasmatique en œstradiol chez les mâles témoins, contrôles et intoxiqués tout au long de l'expérience

a) Chez les mâles

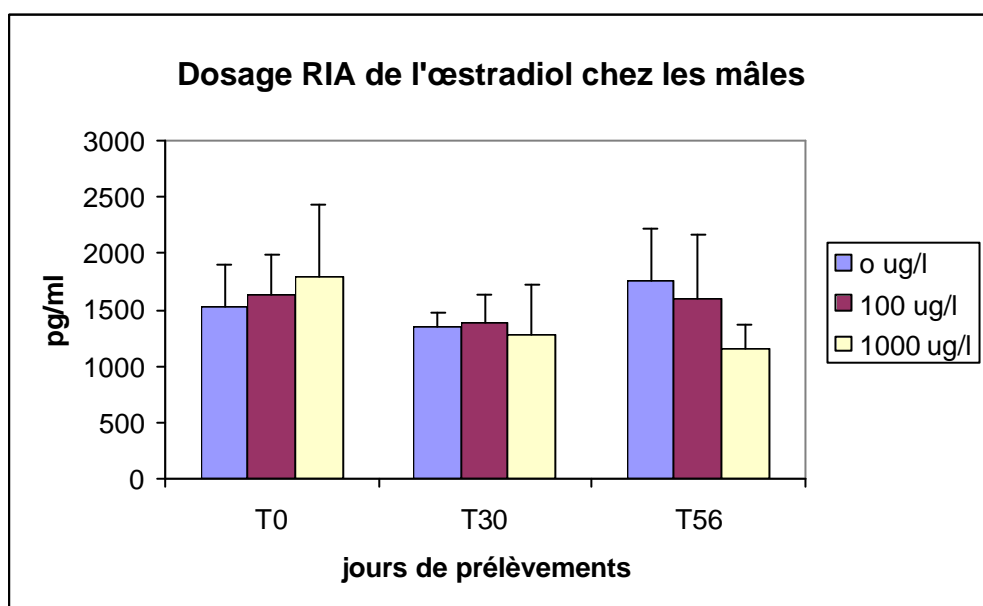


Figure 17 : Evolution de l'œstradiol chez les mâles pendant les 56 jours de contamination. Les valeurs sont exprimées en moyennes et en écarts-types.

Les niveaux plasmatiques en œstradiol chez les mâles contrôles se situent entre 986 et 2053 pg/ml.

Au cours de l'expérience, ni l'effet dose, ni l'effet temps n'a été décelé sur les concentrations plasmatiques en œstradiol chez les individus mâles.

b) Chez les femelles

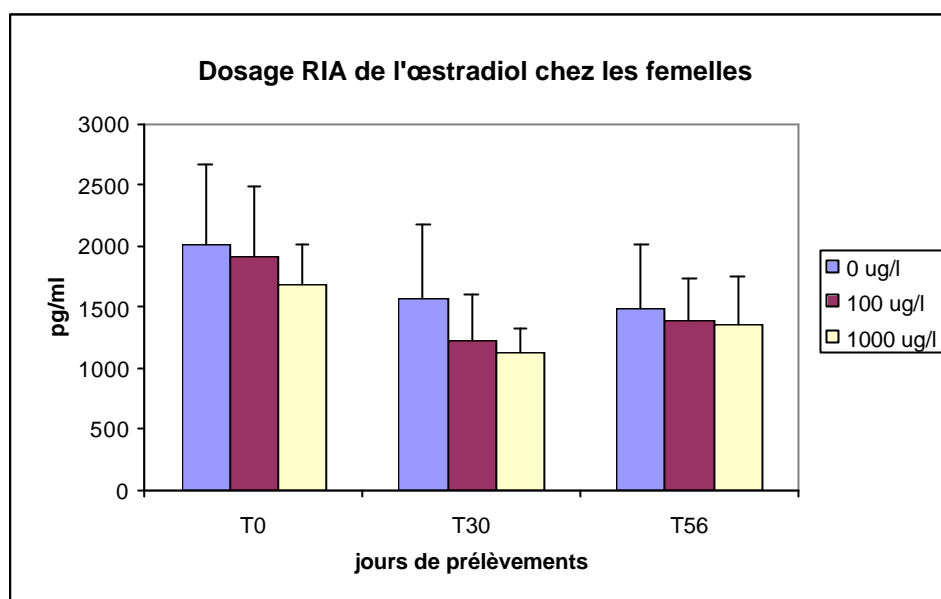


Figure 18 : Evolution de l'œstradiol chez les femelles pendant les 56 jours d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en moyennes et écarts-types.

Les niveaux plasmatiques en œstradiol chez les femelles contrôles se situent entre 1139 et 2122 pg/ml.

Comme pour les mâles, nous ne constatons aucun effet dose, ni d'effet temps sur les concentrations plasmatique en œstradiol chez les femelles. Nous pouvons aussi constater que la variabilité interindividuelle est moins importante que chez les femelles.

V

Discussion générale et perspectives

V. Discussion et perspectives

Les résultats obtenus par Spano' *et al.* (2003) ont mis en évidence certains effets de l'atrazine chez le poisson rouge (*Carassius auratus auratus*) adulte contaminé aux même doses que dans le cadre de cette étude, sur une durée de 21 jours. Ils ont notamment constaté une altération dans la dynamique des stéroïdes sexuels.

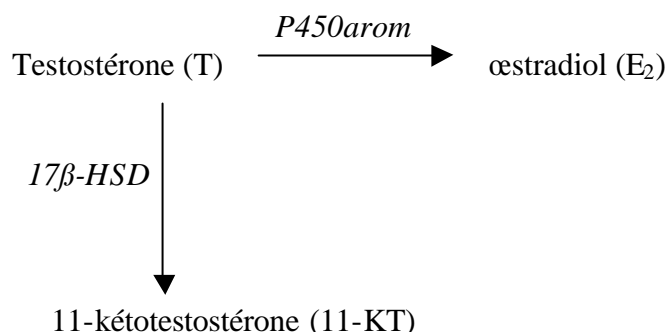
Chez les individus mâles adultes contaminés à la dose d'atrazine de 1000 µg/l pendant 21 jours, il a été constaté:

- une diminution significative de la testostérone ;
- un effet temps et dose dépendant qui a pour effet d'augmenter les concentrations plasmatiques en œstradiol ;
- et un effet dose qui se traduit par la diminution de la 11-KT.

Un ratio entre la testostérone et l'œstradiol a également été calculé. Les études statistiques non paramétriques ont également montré un effet dose significatif sur le ratio E_2/T chez les mâles après 21 jours de contamination à une concentration de 1000 µg/l.

Le fait que nous ayons une diminution des androgènes et une augmentation des œstrogènes indique que l'atrazine pourrait avoir un impact sur la voie de biosynthèse des stéroïdes sexuels chez les poissons mâles, dans ce cas se serait l'aromatase puisque c'est cette enzyme qui est responsable de leur conversion.

Cependant, dans notre cas, le profil hormonal des poissons juvéniles intoxiqués, montrent des effets de l'atrazine beaucoup moins évidents que l'expérience réalisée sur les poissons adultes. Les dosages hormonaux n'ont montré aucune variation de l'œstradiol, que ce soit pour les mâles ou pour les femelles. Par contre, la 11-Kétotestostérone semble être affectée chez les deux sexes. Remarquons que les mâles ne montrent pas d'effet significatif, seule une tendance a été observée. Une hypothèse, est que la variabilité interindividuelle chez les témoins aurait pu masquer un effet de la dose ou bien, une prolongation de la contamination sur les juvéniles aurait pu montrer l'effet de manière significative. La variabilité interindividuelle semble être moins importante chez les poissons rouges adultes. Pour ce qui est de la testostérone, faute de temps, nous n'avons pu obtenir les résultats du dosage RIA. La testostérone est en réalité le substrat des deux hormones dosées (la 11-KT et l' E_2). La 11-KT est majoritairement produite au niveau du testicule, l' E_2 est majoritairement produite au niveau des ovaires.



Dans le cadre de cette expérience et appuyé par les résultats de Spano' *et al.* (2003), nous pouvons émettre l'hypothèse que l'atrazine a un effet sur la biosynthèse de la 11-KT chez les mâles, comme chez les femelles. Dès lors, plusieurs possibilités sont envisageables : inhibition de l'enzyme qui convertit la testostérone en 11-kétotestostérone, diminution du

substrat ou encore dégradation de la 11-kétotestostérone. Une diminution du substrat semble être l'hypothèse la moins probable car nous aurions du également voir un effet sur les niveaux plasmatiques en œstradiol. Remarquons que l'étude de Spano' *et al.* (2003) ont vu un tel effet. Une des perspectives de cette étude serait de se focaliser sur ces différentes possibilités afin de comprendre les causes de la diminution des androgènes. Dans une étude réalisée sur des mâles matures de *Salmo salar* L., Moore et Waring (1998) ont révélé que l'atrazine à une concentration de 3,6 et 6 µg/l altérait les concentrations plasmatiques en testostérone et 11-kétotestostérone respectivement. Friedmann (2002) démontre que cette diminution de la concentration en testostérone est due à un effet inhibiteur de la fonction des cellules de Leydig. D'autre part, il serait judicieux de commencer par évaluer la concentration en testostérone pour voir si le substrat a été affecté par l'atrazine.

Les résultats obtenus pour l'expression du gène de l'aromatase au niveau des gonades femelles, n'ont décelé aucun effet de l'herbicide sur son expression. Ceci confirme les résultats obtenus lors du dosage RIA réalisé sur le plasma des individus femelles. En effet, ni notre étude, ni celle de Spano' *et al.* (2003) n'avaient décelé une anomalie entre la testostérone et l'œstradiol, produit de la conversion de l'aromatase, chez les femelles contaminées aux deux doses d'atrazine. Il aurait été plus intéressant de pouvoir analyser les niveaux de transcrits de l'aromatase chez les mâles puisque selon l'étude précédente il y aurait un effet au niveau de la conversion de la testostérone en œstradiol. De plus, certaines études *in vitro* ont d'ailleurs montré que l'atrazine provoquait une augmentation de l'activité de l'aromatase sur une lignée cellulaire humaine (Sanderson *et al.*, 2000). *In vivo*, cette induction a été détectée chez des juvéniles mâles d'alligators quant l'exposition à lieu juste après l'éclosion (Crain *et al.*, 1999). Chez le rat, on suspecte l'atrazine d'interagir avec l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadal (Stoker *et al.*, 1999 ; Cooper *et al.*, 2000). Les études de Hayes *et al.* (2002) ont montré que l'atrazine cause un hermaphrodisme et une démasculinisation du xénope.

Notons que l'étude réalisée sur les juvéniles n'a montré aucune variation de l'œstradiol chez les mâles.

Un autre point soulevé par l'étude des niveaux de transcrits de l'aromatase, est la variabilité interindividuelle. Comme les juvéniles se trouvent proches du stade de maturation (1 an), nous avons tenté de mettre en relation l'indice gonadosomatique et l'expression de l'aromatase, pour vérifier qu'il n'y avait pas un début de la maturation chez certains individus. En effet, lors de la dissection, certaines gonades montraient une maturité, de la laitance pour les mâles et des ovocytes pour les femelles. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une telle hypothèse. De plus, le GSI ne présentait pas des valeurs significatives de maturité (entre 0,5 et 2,3%). Une analyse histologique aurait pu confirmer ou infirmer la maturation de certains poissons juvéniles.

Comme il n'y a pas vraiment de corrélation entre les deux études, nous pourrions en perspective étudier l'activité de l'aromatase chez les mâles de poissons rouges adultes contaminés aux mêmes concentrations utilisées dans les deux études précédentes. Ceci nous permettrait de prouver que c'est effectivement l'aromatase, enzyme intervenant dans la stéroïdogenèse, qui altère les niveaux plasmatiques des hormones sexuelles démontré dans l'étude de Spano' *et al.* (2003). D'autre part, il faut savoir que le poisson rouge est un poisson faisant partie de la famille des cyprinidés et est une espèce connue pour être relativement bien résistante. En effet, Il serait intéressant de se demander si les effets de l'atrazine observés lors des expériences réalisées au sein du laboratoire, sont susceptibles de se répercuter sur le succès de reproduction de l'espèce étudiée. En ce qui concerne le milieu naturel, on ne

rencontre généralement pas des concentrations aussi élevées qu'utilisées lors de l'expérience, excepté peut être juste après une pulvérisation. Des concentrations allant jusqu'à 740 µg/l d'atrazine ont déjà pu être identifiées dans les eaux de surface (Spano' *et al.*, 2003).

De plus, toutes les espèces ne réagissent de la même façon face à une même concentration d'atrazine, certaines espèces seront plus sensibles comme les salmonidés, d'autres seront moins affectées comme ce cyprinidé *Crucian carp* où la LC50 après 96 heures est supérieure à 100 mg/l (Huber, 1993).

En guise de conclusion, nous pouvons émettre l'idée que l'atrazine semble affecter la 11-KT. Toutefois, les fortes concentrations nécessaires pour observer ces effets nous laissent penser que cet herbicide aurait un faible voire aucun impact sur les populations naturelles de poissons rouges, *quid* pour des espèces plus sensibles. Par ailleurs, il ne faut pas oublier que les populations naturelles ne sont pas soumises qu'à un seul type de polluant mais à toute une panoplie de composés de structure et de toxicité différentes les uns des autres et où des interactions entre polluants pourraient les rendre encore plus dangereux ou induire un effet insidieux, en créant des perturbations seulement à la descendance.

D'un point de vue technique, il nous semble que les techniques de la PCR en temps réel sont bien adaptées pour suivre l'expression d'un gène lors d'études écotoxicologiques et seront certainement amenées à l'avenir à jouer un rôle majeur dans l'avancée des connaissances sur les effets des polluants sur la physiologie et plus spécialement sur la reproduction d'espèces sauvages. Toutefois, ce travail nous a permis de mettre en évidence les étapes critiques. Ainsi, il faut s'assurer de la quantité du matériel disponible. En effet, les gonades de poissons juvéniles peuvent s'avérer être très petites et donc se traduire en une insuffisance de matériel, d'autant plus que le poisson rouge ne présente pas de dimorphisme sexuel et donc pourrait donner un déficit dans l'un ou l'autre sexe. Un 'pool' de tissu serait alors nécessaire pour l'optimisation de l'extraction.

Le broyage du tissu avec un *ultraturax* permettrait de donner un meilleur rendement à l'extraction d'ARN totaux surtout lorsqu'il s'agit de travailler avec du tissu. Aussi, lorsque la gonade dépasse un certain poids, broyer l'ensemble du tissu pour ensuite prélever la quantité nécessaire pour l'extraction, ceci permettrait d'homogénéiser l'ensemble du tissu et ainsi rendre significatif la composition de l'entièreté du tissu étudié.

Même si la technique PCR en temps réel présente un certain nombre d'avantages, la PCR classique reste également une méthode efficace pour montrer de tels effets et a surtout l'avantage d'être moins coûteuse.

VI

References

Afonso L.O., Campbell P.M., Iwama G.K., Devlin R.H., Donaldson E.M. The effect of the aromatase inhibitor fadrozole and two polynuclear aromatic hydrocarbons on sex steroid secretion by ovarian follicles of coho salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* **106**, 169-174 (1997).

Akhtar M., Lee-Robichaud P., Akhtar M.E. et Wright J.N. The Impact of Aromatase Mechanism on Other P450s. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **61**, 127-132 (1997).

Arora N., Kulshrestha S.K. Comparison of the toxic effects of two pesticides on the testes of a freshwater teleost, *Channa striatus*. Bl. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **12**, 435-441 (1984).

Arukwe A. Cellular and molecular responses to endocrine modulators and the impact on fish reproduction. *Mar. Poll. Bull.* **42** (8), 643-655 (2001).

Balm P.H.M. Stress Physiology in Animals. *Sheffield Academic Press, CRC Press*, (1999).

Batty J. et Lim R. Morphological and reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated waters in New South Wales, Australia. *Arch Environ Contam Toxicol* **36**, 301-307 (1999).

Bevans H.E., Goodbred S.L., Miesner J.F., Watkins S.A., Gross T.S., Denslow N.D. et Schoeb T. Synthetic organic compounds and carp endocrinology and histology in Las Vegas Wash and Las Vegas and Callville Bays of Lake Mead, Nevada, 1992 and 1995. *Water Resources Investigations Report*, 96-4266 (1996).

Bhattacharya L., Pandey A.K. Inhibition of steroidogenesis and pattern of recovery in the testes of DDT exposed cichlid, *Oreochromis mossambicus*. Bangladesh. *J. Zool.* **17**, 1-14 (1989).

Blaschke V., Reich K. Rapid quantitation of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte-derived dendritic cells: validation of a new real-time RT-PCR technology. *J. Immunol Methods* **246**, 79-90 (2000).

Bortone S.A. et Cody R.P. Morphological masculinization in poeciliid females from a paper mill effluent receiving tributary of the St. Johns Rivers, Florida, USA. *Bull Environ Contam Toxicol* **63**, 150-156 (1999).

Brueggemeier R., Richards J., Joomprabutra S., Bhat A., Whetstone J. Molecular pharmacology of aromatase and its regulation by endogenous and exogenous agents. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **79**, 75-84 (2001).

Callard G, Tchoudakova A, Kishida M, Wood E. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of *cyp19* genes in teleost fish. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **79**, 305-314 (2001).

Callard G et Tchoudakova A. Evolutionary and functional significance of two *cyp19* genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **61**, 387-392 (1997).

Chomezynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate – phenol – chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159 (1987).

Cooper R.L., Stoker T.E., Tyrey L., Goldman J.M., McElroy W.K. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol. Sci.* **53**, 297-307 (2000).

Crain D.A., Guillette L.J.Jr. Endocrine-disrupting contaminants and reproduction in vertebrate wildlife. *Reviews in Toxicology* **1**, 47-70 (1997).

Crain D.A., Spiteri I.D., Guillette L.J. The functional and structural observations of the neonatal reproductive system of alligators exposed *in ovo* to atrazine, 2,4-D or estradiol. *Toxicology and industrial Health* **15** (1-2), 180-185 (1999).

Damstra T., Barlow S., Gergman A., Kavlock R., Van Der Kraak G. Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. *World Health Organization*, (2002).

Danzo B.J. Environmental xenobiotic may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ Health Perspect* **105**, 294-301 (1997).

Donati L., Funari E. Review of leaching characteristics of triazines and their degradation products. *Ann. Ist. Sanita.* **29** (2), 225-241 (1993).

Folmar L.C., Denslow N.D., Rao V., Crow M., Crain D.A., Enblom J., Marcino J. et Guillette L.J. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* **104**, 1096-1101 (1996).

Fostier A., Jalabert B. Steroidogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at various preovulatory stages: changes in plasma hormone levels and in vivo and in vitro responses of the ovary to salmon gonadotropin. *Fish Physiol. Biochem.* **2**, 87-99 (1986).

Gelinas D, Pitoc G, Callard G. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Molecular and Cellular Endocrinology* **138**, 81-93 (1998).

Gimeno S., Gerritsen A., Bowmer T. et Komen H. Feminization of male carp. *Nature* **384**, 221-222 (1996).

Gimeno S. The estrogenicity of alkyphenols in the aquatic environment. An approach for risk assessment using various lifestages of all male carp populations. *Ph.D. Thesis, University of Utrecht, The Netherlands*, 133 pp. (1997).

Gimeno S., Komen H., Gerritsen A.G.M. et Bowmer T. Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquat Toxicol.* **43**, 77-92 (1998).

Gluth G. et Hanke W. A. Comparison of Physiological Changes in Carp, *Cyprinus carpio*, Induced by Several Pollutants at Sublethal Concentrations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **9**, 179-188 (1985).

Goodbred S.L., Gilliom R.J., Gross T.S., Denslow N.P., Bryant W.L. et Schoeb T.R. Reconnaissance of 17 β -estradiol, 11-ketotestosterone, vitellogenin, and gonad histopathology in common carp of United States streams: potential for contaminant-induced endocrine disruption. *Geological Survey*, 47 pp. 96-627 (1997).

Graymore M., Stagniti F., Allison G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environnement international* **26**, 483-495 (2001).

Hankinson O. The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 307-340 (1995).

Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neal P., Sumpter J.P., Tylor T. et Zaman N. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ Toxicol Chem* **16**, 534-542 (1997).

Harries J.E., Janbakhsh A., Jobling S., Matthiessen P.J.P. et Tyler C.R. Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. *Environ Toxicol Chem* **18**, 932-937 (1999).

Hayes T.B., Collins A., Lee M., Mendoza M., Noriega N., Stuart A.A. et Vonk A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *PNAS* **99**, 5476-5480 (2002).

Huber W. Ecotoxicological relevance of atrazine in aquatic systems. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**, 1865-1881 (1993).

IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks hum. **73**, 59-99 (1999).

Indarto D. et Izawa M. Steroid Hormones and Endocrine Disruptors: Recent Advances in Receptor-Mediated actions. *Yonago Acta medica* **44**, 1-6 (2001).

Ioannides C. Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological aspects. *CRC Press*, (1996).

Jobling S., Sheahan D.A., Osborne J.A., Matthiessen P. et Sumpter J. P. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem* **15**, 194-202 (1996).

Jobling S. Review of suggested testing methods for endocrine-disrupting chemicals. In: natural and anthropogenic environmental oestrogens (1998).

Kelce W.R., Stone C.R., Laws S.C., Gray L.E., Kemppainen J.A., Wilson E.M. Persistent DDT metabolite *p*, *p'*-DDE is a potent androgen antagonist. *Nature* **376**, 581-585 (1995).

Kime D.E. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *The Science of the Total Environment* **225**, 3-11 (1999).

Kime D.E. Endocrine disruption in fish. *Kluwer Academic Publishers*. 396 p. (1998).

Kime D.E., Nash J.P. et Scott A.P. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquacult* **177**, 345-352 (1999).

Kishida M. et Callard G. Distinct Cytochrome P450 Aromatase Isoforms in Zebrafish (*Danio rerio*) Brain and Ovary Are Differentially Programmed and Estrogen Regulated during Early Development. *Endocrinology* **142**, 740-750 (2001).

Koger C., Hinton D. *p-tert*-octylphenol and or vinclozolin induced intersex developing Medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicologist*. **48**, p. 268 (1999).

Kovacs T.G., Gibbons J.S., Tremblay L.A., O'Connor B.I., Martel P.H. et Voss R.I. The effect of a secondary-treated kraft pulpmill effluent on aquatic organisms as assessed by short-term and long-term laboratory tests. *Ecotoxicol Environ Saf* **31**, 7-22 (1995).

Larsson Å., Förlin L., Lindesjö E. et Sandström O. Monitoring of individual organism responses in fish populations exposed to pulp mill effluents. In: *Rotura, New Zealand, Proc. 3rd Int. Conf. on Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, November (1997).

Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Petterson M., Berg A.H., Olsson P-E et Förlin L. Ethinyloestradiol-an undesired fish contraceptive? *Aquat Toxicol* **45**, 91-97 (1999).

Madigou T., Le Goff P., Salbert G., Cravedi J.P., Segner H., Pakdel F., Valotaire Y. Effects of nonylphenol on estrogen receptor conformation, transcriptional activity and sexual reversion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* **53**, 173-186 (2001).

McMaster M.E., Van Der Kraak G.J., Portt C.B., Munkittrick K.R., Sibley P.K., Smith I.R. et Dixon D.G. Changes in hepatic mixed-function oxidase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* **21**, 199-218 (1991).

McMaster M.E., Portt C.B., Munkittrick K.R. et Dixon D.G. Milt characteristics, reproductive performance and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Ecotoxicol Environ Saf* **23**, 103-117 (1992).

Mellanen P., Soimasuo M., Holmbom B., Oikari A. et Santti R. Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus*) exposed to effluents from pulp and paper mills. *Ecotoxicol Environ Saf* **43**, 133-137 (1999).

Ministère de la région wallonne. L'environnement wallon à l'aube du 21^{ème} siècle, approche évolutive. 420 p, 103-108 (2000).

Monteiro P.R.R., Reis-Henriques M.A., Coimbra J. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic toxicology* **48**, 549-559 (2000).

Moore, A., Waring, C.P., Mechanistic effect of a triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) *parr. Pest. Biochem. Physiol.* **62**, 41-50 (1998).

Munkittrick K.R., Portt C.B., Van Der Kraak G.J., Smit I.R., Rokosh D.A. Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels

of a lake Superior with sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **48**, 1371-1380 (1991).

Neubert D. Vulnerability of the Endocrine System to Xenobiotic Influence. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **26**, 9-29 (1997).

Noaksson E., Linderöth M., Bosveld A.T.C., Norrgren L., Zebühr Y. Endocrine disruption in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to leachate from a public refuse dump. *The Science of the Total Environment* **305**, 87-103 (2003).

Okey A.B., Riddick D.S. et Harper P.A. The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol. Lett.* **70**, 1-20 (1994).

Pelissier C., Lenczowski M. J. P., Chinzi D., Davail-Cuisset B., Sumpter J. P. et Fostier A. Effects of flavonoids on aromatase activity, an *in vitro* study. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **57**, 215-223 (1996).

Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real –time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45 (2001).

Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R. et Sumpter J.P. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* **8**, 275-285 (1994).

Robinson R.D. Evaluation and development of laboratory protocols for predicting the chronic toxicity of pulp mill effluents to fish. PhD thesis. Guelph, Canada: University of Guelph, p. 150 (1994).

Rosa-Molinar E. et Williams C.S. Notes on the fecundity of an arrhenoid population of mosquito fish, *Gambusia affinis holbrooki*. *Northeast Gulf Sci* **7**, 121-125 (1984).

Sanderson J.T., Seinen W., Giesy J.P. et Van Den Berg M. 2-Chloro-s-Triazine Herbicides Induce Aromatase (CYP19) Activity in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells: A Novel Mechanism for Estrogenicity? *Toxicological Sciences* **54**, 121-127 (2000).

Scholz S., Gutzeit H.O. 17- α -ethinylestradiol affect reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic toxicology* **50**, 363-373 (2000).

Séralini G.E., Moslemi S. Aromatase inhibitors : past, present and future. *Molecular and Cellular Endocrinology* **178**, 117-131 (2001).

Shilling A.D., Carlson D.B., Williams D.E. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as a model for aromatase inhibition. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **70**, 89-95 (1999).

Shukla J.P., Pandey K. Ovarian recrudescence in a freshwater teleost, *Sarotherodon mossambicus* in DDT treatment and pattern of recouplement. *J. Environ Biol.* **6**, 195-204 (1985).

Simpson E.R., Clyne C., Rubin G., Boon W.C., Robertson K., Britt K., Speed C. et Jones M. Aromatase, A Brief Overview. *Annu. Rev. Physiol.* **64**, 93-127 (2002).

Singh P.B., Kime D.E., Epler P., Chyb J. Impact of γ -hexachlorocyclohexane exposure on plasma gonadotropin levels and *in vitro* stimulation of gonadal steroid production by carp hypophyseal homogenate in *Carassius auratus*. *J. Fish Biol.* **44**, 195-204 (1994).

Spano L., Tyler C.R., Aerle R.V., Devos P., Mandiki S.N.M., Silvestre F., Thomé J.P. et Kestemont P. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicol.*, Accepted (2003).

Stoker T.E., Robinette C.L., Cooper R. Maternal exposure to atrazine during lactation suppresses suckling-induced prolactin release and results in prostatitis in the adult offspring. *Toxicol. Sci.* **52**, 68-79 (1999).

Tchoudakova A., Kishida M., Wood E., Callard G. Promoter characteristics of two *cyp19* genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **78**, 427-439 (2001).

Tennant M.K., Scott Hill D., Eldridge C. Chloro-s-triazine antagonism of estrogen action: Limited interaction with estrogen receptor binding. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **43**, 197-211 (1994).

Tong S.K., Feng-lin Chiang E., Hsiao P.H., Chung B.C. Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish *cyp19* (P450 aromatase) genes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **79**, 299-303 (2001).

Trant J., Lehrter J., Gregory T., Nunez S. et Wunder J. Expression of Cytochrome P450 Aromatase in the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **61**, 393-397 (1997).

Tyler C.R. et Routledge E.J. Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl Chem* **70**, 1795-1804 (1998).

Van Der Kraak G.J., Munkittrick K.R., McMaster M.E., Portt C.B. et Chang J.P. Exposure to bleached kraft mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicol Appl Pharmacol* **115**, 224-233 (1992).

Vinggaard A.M., Hnida C., Breinholt et Larsen J.C. Screening of Selected Pesticides for Inhibition of CYP19 Aromatase Activity In Vitro. *Toxicology in Vitro* **14**, 227-234 (2000).

Vos J.G., Dybing H.A., Ladefeld O., Lombre C., Tarazona J.V., Brandt I., Vethook A.D. Health effect of endocrine disrupting chemicals on wildlife system, with a special reference to the European situation. *Critical Review in Toxicology* **30** (1), 71-133 (2000).

VII

Annexes

VII. Annexes

Annexe 1

Protocole de préparation des solutions de contamination par l'atrazine :

- 0,15 g (dose 100 µg/l) ou 1,5 g (dose 1000 µg/l) d'atrazine (atrazine Pestanal®, Riedel-de-haën)
- 8 ml d'acétone (solubilité de l'atrazine dans l'acétone : 31 g/l)
- Agiter jusqu'à dissolution complète de l'atrazine
- Verser la solution d'atrazine dans 1 litre d'eau milliQ
- Agiter et chauffer la solution jusqu'à 90°C (la température d'évaporation de l'acétone est de 56°C)
- Agiter jusqu'à homogénéisation complète
- Laisser refroidir la solution
- Verser dans le système ESCADA

Annexe 2

Protocole d'extraction de l'atrazine sur cartouche

- Prendre 200 ml d'eau des bassins contaminés
- Filtrer le volume prélevé sur un filtre pour HPLC de 45 nm via une pompe à vide
- Conditionner la cartouche (Waters Oasis HLB) avec 3 ml d'acétonitril
- Faire passer 3 ml d'eau ayant filtré sur la cartouche
- Faire passer les 200 ml d'eau filtrée sur la cartouche
- Rincer la cartouche avec 6 ml d'eau milliQ
- Faire passer 3 ml d'acétonitril sur la cartouche
- Récupérer l'éluat dans une fiole pour HPLC
- Procéder à la lecture et comparer les résultats obtenus avec une solution standard d'atrazine (Pesticide –Mix 15, Dr. Ehrenstorfer)

Annexe 3

Protocole de préparation des différents tampons utilisés dans le dosage des hormones

1) Tampon phosphate

NaH ₂ PO ₄	0,01 M	anhydre	1,20 g/l (si monohydraté : 1,37 g/l)
Na ₂ HPO ₄	0,01 M	anhydre	1,42 g/l
NaCl	0,9 %		9,0 g/l

Ajuster le pH à 7,25 avec du NaOH

2) Tampon phosphate gélatiné (TPG)

Ajouter 1 g de gélatine par litre de tampon phosphate (diluer la gélatine dans une partie du tampon chauffé à 60°C en agitant).

3) Tampon polyéthylèneglycérol 25 % (PEG)

Ajouter 25 g de PEG à 75 ml de tampon phosphate sans gélatine.

Protocole de préparation de la courbe standard

Pour chaque hormone, on prépare une solution mère (M) : 100 µg d'hormone froide dans de l'éthanol absolu à température ambiante (20°C). Les trois hormones utilisées sont les suivantes :

- 17β-œstradiol de bovin (Sigma E-8875)
- Testostérone de bovin (Sigma T-1500)
- 11-kétotestostérone (...)

- Solution A : 1 ml de solution mère porté à 100 ml avec du TPG : 1000 ng/l
- Solution B : 1 ml de solution A porté à 100 ml avec du TPG : 100 ng/l
- Solution C : 1 ml de solution B porté à 100 ml avec du TPG : 10 ng/l
- Solution D : 1 ml de solution C porté à 100 ml avec du TPG : 1 ng/l